

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA

GRAZIELE FRANCINE FRANCO



BIOPROSPECÇÃO DAS PARTES AÉREAS E ÓLEO ESSENCIAL DE
Liquidambar styraciflua L., **ALTINGIACEAE**

CURITIBA
2013

GRAZIELE FRANCINE FRANCO

**BIOPROSPECÇÃO DAS PARTES AÉREAS E ÓLEO ESSENCIAL DE
Liquidambar styraciflua L., ALTINGIACEAE**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Tomoe Nakashima

CURITIBA


2013

TERMO DE APROVAÇÃO


GRAZIELE FRANCINE FRANCO

**Título: BIOPROSPECÇÃO DAS PARTES AÉREAS E ÓLEO
ESSENCIAL DE LIQUIDAMBAR STYRACIFLUA L.,
ALTINGIACEAE**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.


Prof.ª Dra. Tomoe Nakashima
Orientadora


Prof.ª Dra. Patrícia Mathias Döll Boscardin
Universidade Estadual de Ponta Grossa


Prof.ª Dra. Maria Aparecida Barbato Frazão Vital
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 18 de fevereiro de 2013.

Franco, Grazielle Francine
Bioprospecção das partes aéreas e óleo essencial de *Liquidambar styraciflua* L., Altingiaceae / Grazielle Francine Franco – Curitiba, 2013.
117 f. : il. ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Tomoe Nakashima
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade
Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. *Liquidambar styraciflua*. 2. Atividade antioxidante. 3. Atividade antimicrobiana. 4. Atividade hemolítica. 5. Óleo essencial. I. Nakashima, Tomoe. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 615.1

Dedico este trabalho ao meu esposo, Rodrigo Mancarz
E aos meus pais, Francisco e Isolde Franco,
Os maiores incentivadores desta conquista.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente em minha vida, me iluminando, abençoando e guiando os meus passos nesta jornada.

À minha família, pela união e o amor que nos fortalece todos os dias.

Ao meu pai, Francisco de Assis Franco, meu co-orientador, pelos ensinamentos estatísticos, pelas correções e sugestões, pelo incentivo em todos os momentos deste trabalho e, principalmente, pelo exemplo de ser humano e profissional que você é para mim.

À minha mãe, Isolde S. Franco, que sempre me ajudou com suas palavras, com seu amor e carinho, tornando possível superar todos os momentos difíceis.

Ao meu esposo, Rodrigo Mancarz, pelo amor incondicional, pelos pensamentos positivos, pela paciência e pela alegria que você sempre me deu, tornando esta jornada mais fácil por estar ao seu lado.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Tomoe Nakashima, pelo acolhimento, orientação, amizade, paciência e carinho maternal. Muito obrigada pela confiança depositada e pelos conselhos, profissionais e pessoais, e, é claro, pelos cafezinhos e conversas que tornavam o dia melhor.

Aos membros de avaliação da banca na defesa desta dissertação, Prof^a Dr^a Patrícia Mathias Doll Bocardin (UEPG) e Prof^a Dr^a Maria Aparecida Barbato Frazão Vital (UFPR), que contribuíram com sugestões e estímulo para a melhoria desta dissertação.

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Programa de Apoio ao Plano de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (REUNI), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação, por todos os conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. MSc. João Carlos Possamai, pelo auxílio no desenvolvimento das análises estatísticas desta pesquisa e pela amizade.

Ao Prof. Fabio Murakami, pela acolhida e abertura no Laboratório de Controle de Qualidade II – Departamento de Farmácia/UFPR - para a realização dos ensaios microbiológicos.

Ao Vitor Vlnieska, técnico do Laboratório de Controle de Qualidade II e amigo, pelo companheirismo, paciência e auxílio na realização desta pesquisa, além das boas conversas e risadas.

À Maria da Graça Teixeira de Toledo, farmacêutica da Central Analítica – Departamento de Farmácia/UFPR, pela simpatia, amizade, e pelos ensinamentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Geraldo Picheth e Prof. MSc. Railson Henneberger, pelo empréstimo das micropipetas de multicanais e demais equipamentos necessários para a realização das análises microbiológicas.

A Prof^a Cyntia Maria Telles Fadel-Picheth, pela abertura do Laboratório de Bacteriologia Clínica.

Ao Prof. Dr. Wesley Mauricio de Souza, pelo auxílio na realização dos ensaios de difusão em ágar e pelos conhecimentos transmitidos.

À amiga e colega de mestrado, Mariáh Brandalise Baril, pela amizade que se formou em um momento difícil e que foi a grande responsável pela continuação deste projeto. Obrigada por toda ajuda, pelas inúmeras conversas e risadas, pelos almoços (caseiros e do RU), discussões de metodologias e pelo companheirismo em todos os momentos, inclusive fora da faculdade.

À amiga e companheira de mestrado, Ana Carolina Pareja Lobo, pela amizade, pelo carinho e incentivo constante, pela ajuda em todos os momentos, e, principalmente, pelos momentos de descontração nos intervalos dos ensaios e fora da faculdade.

À todos os colegas, de mestrado e doutorado, sob orientação da Prof^a Dr^a Tomoe Nakashima: Priscila G. Sieben, Bárbara Moriel, Stella M. Siu Ló, Sayonara M. Silva e Antônio Waldir C. da Silva, pelo companheirismo, por toda a ajuda durante a realização deste trabalho e pela amizade.

Aos estagiários do Laboratório de Fitoquímica/UFPR: Allan V. F. Lourenço, Andréa Beatriz Alves, Simone Yae Abe, Suelen Carla Nichelle, Marina W. Pereira, Maria Eduarda A. Maul e Sabrina Freitas de Oliveira, pelo auxílio nos experimentos e pela convivência diária que tornava o nosso local de trabalho mais animado.

Às minhas amigas farmacêuticas e comadres: Ana Paula F. Monteiro, Carine de A.M.P. Oliveira e Fernanda L.F. Basilio, pelo carinho, pela amizade e pelo apoio na realização desta jornada.

Aos servidores e funcionários da UFPR.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta pesquisa.

“Um dia sem sorrir, é um dia perdido.”

Charles Chaplin

*“Só existem dois dias no ano nos quais nada
pode ser feito. Um se chama ontem e o outro, amanhã, portanto hoje é o dia certo
para amar, acreditar, fazer e, principalmente, viver.”*

Dalai Lama

RESUMO

Liquidambar styraciflua L. é uma espécie exótica adaptada nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. O seu principal uso consiste na madeira de excelente qualidade que ela fornece (sendo utilizada para a produção de celulose e papel, pela indústria de madeira serrada e laminada), podendo também ser utilizada para o reflorestamento, pois possui um rápido crescimento. Além disso, esta árvore apresenta um grande efeito ornamental pelas cores que suas folhas adquirem no outono, e seu tronco exsuda uma goma cor de âmbar que é utilizada em confeitos e para fins medicinais. Poucos estudos relativos à composição fitoquímica desta espécie são encontrados, assim como, das atividades biológicas que seus extratos e óleo essencial apresentam. Dentro deste contexto, o presente estudo teve como objetivo investigar as atividades biológicas de *L. styraciflua*. O material vegetal foi coletado no período do outono e da primavera na Embrapa Florestas, localizada no município de Colombo, região metropolitana de Curitiba, Paraná. As folhas secas foram utilizadas para o preparado do extrato hidroalcoólico e suas respectivas frações. O óleo essencial também foi extraído das folhas secas, por hidrodestilação. As cascas e caule de *L. styraciflua* foram utilizadas para o preparo de um extrato hidroalcoólico e frações orgânicas. Pelo método do fosfomolibdênio, a fração acetato de etila das cascas e caule apresentou a maior capacidade antioxidante total e porcentagem de atividade antioxidante relativa, sendo superior a rutina e ao ácido gálico. Entretanto, pelo método do DPPH, a fração butanol das cascas e caule obteve o maior valor de porcentagem de atividade antioxidante, valor este superior aos encontrados para o ácido ascórbico, rutina e ácido gálico. Neste mesmo ensaio, a fração butanol das cascas e caule e a fração acetato de etila das folhas exibiram valores de CE_{50} próximos aos encontrados para os padrões-referência. Na avaliação da atividade antimicrobiana frente às bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras, somente o óleo essencial apresentou resultados positivos pelo método da difusão. Porém, pela metodologia da microdiluição, os extratos também exibiram atividade antimicrobiana, mas com valores de CIM demonstrando uma atividade moderada a fraca. Pelo teste da difusão em Agar Sangue, a fração butanol das folhas e o óleo essencial foram capazes de provocar a formação de halos de hemólise no meio, indicando atividade hemolítica. Diferentemente, pelo ensaio em tubos de sangue, nenhuma das amostras provocou rompimento dos eritrócitos, ou seja, não exibiram atividade hemolítica. Avaliando os resultados obtidos, são recomendados estudos adicionais visando a utilização desta espécie como um fitoterápico e matéria-prima para a indústria farmacêutica.

Palavras-chave: *Liquidambar styraciflua*, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, atividade hemolítica, óleo essencial.

ABSTRACT

Liquidambar styraciflua L. is an exotic species adapted in the South and Southeast of Brazil. Its main use is the wood of excellent quality it provides (being used for the production of pulp and paper industry of lumber and laminated), and can also be used for reforestation, because it has a rapid growth. Furthermore, this tree has great ornamental effect by the colors that their leaves in autumn acquire, and its trunk exudes a gum amber that is used in confectionery and for medicinal purposes. Few studies on the phytochemical composition of this species are found, as well as their biological activities that extracts and essential oil present. Within this context, the present study aimed to investigate the biological activities of *L. styraciflua*. The plant material was collected during the fall and spring at Embrapa Forestry, located in the city of Colombo metropolitan region of Curitiba, Paraná. The dried leaves were used for the preparation of hydroalcoholic extract and its fractions. The essential oil was also extracted from the leaves by steam distillation. The bark and stems of *L. styraciflua* were used for the preparation of a hydroalcoholic extract and organic fractions. By the method of phosphomolybdenum, the ethyl acetate fraction of the stem and bark had the highest total antioxidant capacity and antioxidant activity relative percentage, being more than rutin and gallic acid. However, by the DPPH method, the butanol fraction from the bark and stem had the highest percentage value of antioxidant activity, higher than those found for ascorbic acid, gallic acid and rutin. In this same essay, the butanol fraction from the bark and stem and ethyl acetate fraction of the leaves exhibited EC₅₀ values close to those found for the standards-reference. In evaluating the antimicrobial activity against Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria and yeast, only the essential oil showed positive results by the method of diffusion. However, by the microdilution method, the extracts also exhibited antimicrobial activity, but with MIC values demonstrating an moderate to weak activity. By the disk diffusion test, in blood Agar, butanol fraction of the leaves and the essential oil were able to cause the formation of halos of hemolysis in the middle, indicating hemolytic activity. In contrast, for test tubes of blood, none of the samples caused disruption of erythrocytes, ie exhibited no hemolytic activity. Evaluating the results, further studies are recommended in order to use this species as a herbal medicine and raw materials for the pharmaceutical industry.

Keywords: *Liquidambar styraciflua* L., antioxidant activity, antimicrobial activity, hemolytic activity, essential oil.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – NÚCLEO FUNDAMENTAL DE UM FLAVONÓIDE E SUA NUMERAÇÃO	30
FIGURA 2 – ESQUEMA DA BIOSÍNTESE DOS TERPENOS	33
FIGURA 3 – MAPA DA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DOS GÊNEROS <i>SEMILIQUIDAMBAR</i> , <i>LIQUIDAMBAR</i> E <i>ALTINGIA</i>	43
FIGURA 4 – ASPECTO GERAL DA ESPÉCIE <i>Liquidambar styraciflua</i> L.	47
FIGURA 5 – DETALHES DO TRONCO DE <i>Liquidambar styraciflua</i> L.	48
FIGURA 6 – DETALHES DAS FOLHAS DE <i>Liquidambar styraciflua</i> L.....	49
FIGURA 7 – FRUTOS DE <i>Liquidambar styraciflua</i> L.	49
FIGURA 8 – ASPECTO DAS FOLHAS DE <i>Liquidambar styraciflua</i> L. NO OUTONO.	50
FIGURA 9 – SOLUÇÃO DE DPPH A 40 µg/mL, ANTES E DEPOIS DE RECEBER UM ELÉTRON DE UMA SUBSTÂNCIA ANTIOXIDANTE.....	58
FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MICROPLACA UTILIZADA PARA A DETERMINAÇÃO DA CIM DAS AMOSTRAS.	64
FIGURA 11 – ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS DE <i>Liquidambar styraciflua</i>	69
FIGURA 12 – FIGURA ILUSTRATIVA DE TUBOS CONTENDO SOLUÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO, APÓS CONDIÇÕES REACIONAIS DO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO.	71
FIGURA 13 – TUBOS CONTENDO SOLUÇÃO DE DPPH E FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS CASCAS E CAULE, APÓS O TEMPO REACIONAL.	82
FIGURA 14 – PLACA ILUSTRANDO OS HALOS DE INIBIÇÃO OBTIDOS PELO ÓLEO ESSENCIAL FRENTE À BACTÉRIA <i>B. subtilis</i> , POR MEIO DO MÉTODO DE DIFUSÃO EM MEIO SÓLIDO A PARTIR DE ORIFÍCIO.	87
FIGURA 15 – PLACA ILUSTRANDO OS HALOS DE INIBIÇÃO OBTIDOS PELOS PADRÕES-REFERÊNCIA FRENTE À LEVEDURA <i>C. glabrata</i> , ATRAVÉS DO MÉTODO DE DIFUSÃO EM MEIO SÓLIDO A PARTIR DE ORIFÍCIO.	92
FIGURA 16 – MICROPLACA COM OS RESULTADOS OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS E CONTROLES FRENTE À BACTÉRIA <i>S. typhimurium</i>	94

FIGURA 17 – PLACA DE AGAR SANGUE COM HALO DE HEMÓLISE DO ÓLEO ESSENCIAL (SUPERIOR DIREITO) E DEMAIS DISCOS REPRESENTANDO O RESULTADO NEGATIVO, SEM HALO DE HEMÓLISE.	100
FIGURA 18 – PLACA DE AGAR SANGUE COM HALO DE HEMÓLISE DO ÓLEO ESSENCIAL E DA FRAÇÃO BUTANOL DAS FOLHAS DE <i>Liquidambar styraciflua</i>	101
FIGURA 19 – TUBOS CONTENDO AS AMOSTRAS QUE FORAM SUBMETIDAS AO ENSAIO DE ATIVIDADE HEMOLÍTICA COM SANGUE DE CARNEIRO.....	102
FIGURA 20 – TUBOS EXIBINDO RESULTADO NEGATIVO PARA ATIVIDADE HEMOLÍTICA, DEVIDO A PRESENÇA DE SOLUÇÃO LÍMPIDA COM DEPÓSITO DE ERITRÓCITOS AO FUNDO.	103

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS PARA O TESTE DE HEMÓLISE	66
TABELA 2 – RENDIMENTO EM % DAS FRAÇÕES DAS FOLHAS E DAS CASCAS E CAULE DE <i>L. styraciflua</i>	69
TABELA 3 – CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL EM CADA CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS E DOS PADRÕES-REFERÊNCIA	72
TABELA 4 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL DAS AMOSTRAS E PADRÕES PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO	73
TABELA 5 – PORCENTAGEM DE DPPH REMANESCENTE EM CADA CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS E PADRÕES-REFERÊNCIA	77
TABELA 6 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA PORCENTAGEM DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS AMOSTRAS E CONTROLES POSITIVOS PELO MÉTODO DO DPPH	82
TABELA 7 – VALORES DAS CE ₅₀ DAS AMOSTRAS E PADRÕES-REFERÊNCIA PELO ENSAIO DO DPPH	84
TABELA 8 – VALORES DO HALO DE INIBIÇÃO APRESENTADOS PELAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÓLEO ESSENCIAL E PELO CONTROLE NEGATIVO *	87
TABELA 9 – VALORES DOS HALOS DE INIBIÇÃO APRESENTADOS PELOS DISCOS DE ANTIBIÓTICOS PADRÕES	88
TABELA 10 – ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL E DOS ANTIBIÓTICOS PADRÕES POR MEIO DA MEDIÇÃO DA REGIÃO DE INIBIÇÃO ENTRE A BORDA DO DISCO/ CAVIDADE E O CRESCIMENTO BACTERIANO * ..	90
TABELA 11 - VALORES DO HALO DE INIBIÇÃO APRESENTADOS PELAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÓLEO ESSENCIAL, CONTROLE NEGATIVO E CONTROLES POSITIVOS *	91
TABELA 12 – CIM (µg/mL) DOS EXTRATOS E ÓLEO ESSENCIAL DE <i>L.styraciflua</i> , FRENTE AS CEPAS BACTERIANAS	95
TABELA 13 - CIM (µg/mL) DOS EXTRATOS E ÓLEO ESSENCIAL DE <i>L.styraciflua</i> , FRENTE AS LEVEDURAS	96

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – CURVA ANALÍTICA DO ÁCIDO ASCÓRBICO	71
GRÁFICO 2 – PERCENTAGEM DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS AMOSTRAS E PADRÕES EM RELAÇÃO AO ÁCIDO ASCÓRBICO PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO	74
GRÁFICO 3 – CURVA ANALÍTICA DO DPPH.....	76
GRÁFICO 4 – CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS, PELO MÉTODO DO DPPH.....	78
GRÁFICO 5 – CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS, PELO MÉTODO DO DPPH	78
GRÁFICO 6 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO BUTANOL DAS FOLHAS, PELO MÉTODO DO DPPH	78
GRÁFICO 7 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA DAS FOLHAS, PELO MÉTODO DO DPPH	79
GRÁFICO 8 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS CASCAS E CAULE, PELO MÉTODO DO DPPH	79
GRÁFICO 9 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS CASCAS E CAULE, PELO MÉTODO DO DPPH.....	79
GRÁFICO 10 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO BUTANOL DAS CASCAS E CAULE, PELO MÉTODO DO DPPH.....	80
GRÁFICO 11 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA DAS CASCAS E CAULE, PELO MÉTODO DO DPPH.....	80
GRÁFICO 12 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA SOLUÇÃO METANÓLICA DE ÁCIDO ASCÓRBICO, PELO MÉTODO DO DPPH.....	80
GRÁFICO 13 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA SOLUÇÃO METANÓLICA DE RUTINA, PELO MÉTODO DO DPPH	81
GRÁFICO 14 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA SOLUÇÃO METANÓLICA DE ÁCIDO GÁLICO, PELO MÉTODO DO DPPH.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

±	Mais ou menos
%AA	Porcentagem de Atividade Antioxidante
%AAR	Porcentagem de Atividade Antioxidante Relativa
AA	Ácido Ascórbico
Abs	Absorbância
ANOVA	Análise de Variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
BHT	Butil-Hidroxi-Tolueno
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CE ₅₀	Concentração necessária para reduzir em 50% o DPPH
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CG-MS	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
cm	Centímetro
COX-2	Ciclooxygenase 2
°C	Graus Celsius
DL ₅₀	Dose letal mediana
DMAPP	Dimetil-alil-difosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DOXP	Deoxi-xilulose-5-fosfato
DP	Desvio Padrão
DPPH	Radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila
%DPPH _{REM}	Porcentagem de DPPH remanescente
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
<i>et al.</i>	Expressão Latina abreviada et alli, (=e outros)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g	Grama
g/%	Relação grama/porcento
GPP	Geranyl difosfato
ha	Hectares
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSV-1	Vírus da Herpes Simples tipo 1
HSV-2	Vírus da Herpes Simples tipo 2
H1N1	Vírus da Influenza tipo A subtipo H1N1 (gripe A)
H5N1	Vírus da Influenza tipo A subtipo H5N1 (gripe aviária)
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-8	Interleucina 8
IPP	Isopentenil difosfato
Kg	Quilograma
L.	<i>Liquidambar</i>

m	Massa
m	Metro
m ³	Metro cúbico
mg/g	Relação miligrama/grama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mol	Unidade de molaridade, quantidade de matéria
mol/L	Relação mol/litro
mmol/L	Relação milimol/litro
MRSA	<i>Methicillin Resistant Staphylococcus aureus</i>
MV	Material Vegetal
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
nm	Nanômetro
n°	Número
OMS	Organização Mundial de Saúde
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
pH	Potencial Hidrogeniônico
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
PR	Paraná
p/p	Relação peso/peso
p/v	Relação peso/volume
®	Marca registrada
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RENAFITO	Relação Nacional de Fitoterápicos
RENAPLAM	Relação Nacional de Plantas Medicinais
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
REUNI	Reestruturação e Expansão das Universidades Federais
RNA	Ácido Ribonucleico
Rpm	Rotações por minuto
SGA	Estreptococos do Grupo A de Lancefield
SUS	Sistema Único de Saúde
sp.	Relativo a espécie do gênero
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral
TTC	Cloreto 2,3,5-trifenil-tetrazólio
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UFC/mL	Relação unidades formadoras de colônia/mililitro
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UV	Ultravioleta
v	Volume
VIS	Visível
v/v	Relação volume/volume
WHO	World Health Organization
µg	Micrograma
µg/mL	Relação micrograma/mililitro
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 REVISÃO DA LITERATURA	22
3.1 PLANTAS MEDICINAIS E A FITOTERAPIA	22
3.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	26
3.2.1 Polifenóis	27
3.2.1.1 Taninos	28
3.2.1.2 Flavonóides	29
3.2.2 Óleos Essenciais	32
3.4 FAMÍLIA ALTINGIACEAE HORAN	40
3.5 GÊNERO <i>LIQUIDAMBAR</i> L.	43
3.5.1 <i>Liquidambar styraciflua</i> L.	46
4 MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1 MATERIAL BOTÂNICO	53
4.1.1 Coleta e identificação botânica	53
4.1.2 Secagem do material botânico	53
4.2 PREPARO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES	54
4.2.1 Preparo do extrato hidroalcoólico a 20% (p/v)	54
4.2.2 Fracionamento do extrato hidroalcoólico	54
4.3 ÓLEO ESSENCIAL	55
4.3.1 Extração do óleo essencial	55
4.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS	56
4.4.1 Capacidade Antioxidante	56
4.4.1.1 Método do Fosfomolibdênio	56
4.4.1.2 Método do DPPH	58
4.4.2 Atividade Antimicrobiana	60
4.4.2.1 Micro-organismos	60
4.4.2.2 Meio de cultura	60
4.4.2.3 Preparo do inóculo	61

4.4.2.4 Difusão em meio sólido a partir de orifício.....	61
4.4.2.5 Teste da Microdiluição em caldo	62
4.4.2.6 Concentração bacteriostática / bactericida mínima (CBM) e concentração fungistática / fungicida mínima (CFM)	64
4.4.3 Atividade Hemolítica	65
4.4.3.1 Atividade Hemolítica em Placas de Agar Sangue	65
4.4.3.2 Atividade Hemolítica em tubos de sangue de carneiro.....	66
4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	67
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
5.1 EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS E FRAÇÕES ORGÂNICAS	68
5.1.2 Rendimentos das frações.....	68
5.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	69
5.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS	70
5.3.1 Capacidade Antioxidante.....	70
5.3.1.1 Método do Fosfomolibdênio	70
5.3.1.2 Método do DPPH	75
5.3.2 Atividade Antimicrobiana	86
5.3.2.1 Difusão em meio sólido a partir de orifício.....	86
5.3.2.2 Teste da Microdiluição em caldo	93
5.3.3 Atividade Hemolítica	100
5.3.3.1 Atividade Hemolítica em Placas de Agar Sangue	100
5.3.3.2 Atividade Hemolítica em tubos de sangue de carneiro.....	101
6 CONCLUSÕES	104
REFERÊNCIAS.....	106

1 INTRODUÇÃO

As plantas são conhecidas pelo seu valor ornamental e por auxiliar no fornecimento de oxigênio, por meio da fotossíntese, mas também como fontes de alimentos, perfumes e material de construção. Além disso, as plantas também são detentoras de um grande número de compostos que possuem atividade medicinal. Por este motivo, as plantas vêm sendo utilizadas desde a idade antiga como remédio pela população, a tradicional medicina popular, e, nos dias de hoje, são cada vez mais utilizadas para este fim, possuindo a denominação de fitoterápicos.

A maioria dos princípios ativos vegetais são substâncias procedentes do metabolismo secundário, sendo sintetizados a partir de intermediários-chave provenientes do metabolismo primário. Estes compostos foram assim denominados, pois acreditava-se que, devido à sua origem, eram somente subprodutos do metabolismo primário. Entretanto, estes metabólitos têm um papel principal nas interações entre as plantas e o seu ambiente (defesa e atração), e alguns podem apresentar atividade farmacológica, o que desperta um interesse científico ainda maior por estes compostos químicos. Outrossim, existem algumas espécies que são aromáticas, ou seja, produtoras de óleos essenciais, que também podem apresentar atividades biológicas de grande interesse (COSTA, 2002; SANTOS, 2007).

Uma família pouco explorada é a família Altingiaceae Horan, constituída por aproximadamente quinze espécies que são divididas em três gêneros: *Liquidambar* L., *Altingia* Noronha e *Semiliquidambar* H-T. Chang (ICKERT-BOND e WEN, 2006). A importância comercial das espécies desta família está relacionada com a indústria do papel, além de possuírem um elevado potencial como plantas ornamentais (DURKOVIC e LUX, 2010). No Brasil, estas espécies são pouco conhecidas pelo fato de serem plantas exóticas, ou seja, plantas oriundas de outros países (LORENZI *et al.*, 2003).

Estudos fitoquímicos e biológicos a cerca das espécies desta família ainda são escassos. Atualmente a comunidade acadêmica tem direcionado trabalhos para estudos filogenéticos, uma vez que Altingiaceae foi elevada ao status de família há pouco tempo, sendo de grande interesse a descoberta de fatores genéticos que confirmem esse reconhecimento.

O gênero *Liquidambar* é o mais conhecido da família, sendo constituído por quatro espécies intercontinentais na zona temperada do hemisfério norte (ICKERT-BOND, PIGG e WEN, 2005). *Liquidambar styraciflua* é uma das espécies deste gênero que já está aclimata no Brasil, apresentando uma boa adaptação nos estados do Sul e Sudeste (LOEWE MUÑOZ, 1992).

Não obstante, *Liquidambar styraciflua* é citada como a mais útil dentro das espécies deste gênero, pois é uma árvore adequada ao reflorestamento, pela madeira retilínea e de boa qualidade que produz, e por apresentar um crescimento relativamente rápido, atingindo a maturidade reprodutiva com cerca de 20 a 30 anos de idade (LORENZI *et al.*, 2003). Esta espécie também apresenta um grande efeito ornamental pelas cores outonais amarelas e vermelhas que as folhas adquirem no inverno, antes de caírem; e seu tronco exsuda uma goma cor de âmbar que é utilizada em confeitos e para fins medicinais (LORENZI *et al.*, 2003; DURKOVIC e LUX, 2010; FLORIDATA, 2011).

A busca por plantas medicinais com atividades comprovadas tem sido cada vez mais intensa no Brasil, principalmente devido às novas políticas de saúde, que incluíram os fitoterápicos na rede pública de assistência a saúde, assim como, nos países desenvolvidos que buscam novas alternativas para o tratamento de diversas doenças. Dentro deste contexto, o presente trabalho será direcionado para a descoberta de atividades biológicas das partes aéreas e do óleo essencial de *Liquidambar styraciflua*, buscando atender interesse científico e econômico.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as atividades biológicas das partes aéreas e do óleo essencial de *Liquidambar styraciflua* L., ALTINGIACEAE.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a coleta e identificação do material botânico a ser estudado;
- Preparar os extratos hidroalcoólicos das folhas de *L. styraciflua*;
- Preparar os extratos hidroalcoólicos das cascas e caule de *L. styraciflua*;
- Realizar a extração líquido/líquido do extrato hidroalcoólico das folhas para obtenção das frações orgânicas;
- Realizar a extração líquido/líquido do extrato hidroalcoólico das cascas e caule para obtenção das frações orgânicas;
- Extrair o óleo essencial das folhas secas de *Liquidambar styraciflua*;
- Avaliar a capacidade antioxidante do extrato hidroalcoólico das folhas, bem como das frações acetato de etila, butanol e hidroalcoólica deste órgão vegetal;
- Avaliar a capacidade antioxidante do extrato hidroalcoólico das cascas e caule desta espécie, assim como das frações acetato de etila, butanol e hidroalcoólica deste órgão vegetal;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico das folhas de *L. styraciflua*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Liquidambar styraciflua*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico das cascas e caule de *L. styraciflua*;
- Avaliar a atividade hemolítica do extrato hidroalcoólico das folhas desta espécie e suas respectivas frações orgânicas;

Avaliar a atividade hemolítica do extrato hidroalcoólico das cascas e caule desta espécie e suas respectivas frações orgânicas;

Avaliar a atividade hemolítica do óleo essencial das folhas de *L.styraciflua*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 PLANTAS MEDICINAIS E A FITOTERAPIA

A utilização das plantas para o tratamento de enfermidades remonta à idade antiga. As grandes civilizações do passado nos forneceram evidências escritas do engenho do homem na utilização de plantas para o tratamento de uma grande variedade de doenças. Na idade das trevas da Europa, toda essa informação teria sido perdida, se não fosse pelos monastérios, que atuaram como centros para a produção de plantas medicinais que foram usadas para curar o sofrimento da humanidade (PHILLIPSON, 2001).

Somente no início do século XIX o homem começou a isolar os princípios ativos das plantas medicinais, onde um marco foi a descoberta da quinina, extraída das cascas da *Cinchona* L., pelos cientistas franceses Pelletier e Caventou em 1820 (OLIVEIRA e SZCZERBOWSKI, 2009). Estas descobertas aumentaram o interesse por plantas no Novo Mundo, o que conduziu a expedições em selvas e florestas para a busca de novos medicamentos (PHILLIPSON, 2001).

Antes da Segunda Guerra Mundial, uma gama de produtos naturais isolados a partir de plantas superiores tornaram-se agentes clínicos e grande parte deles continua em uso, como a própria quinina, a codeína e a morfina (isoladas do látex da *Papaver somniferum* L.), a digoxina (isolada das folhas de *Digitalis* L.), a atropina e a hioscina (obtidas de espécies da família Solanaceae J.), os alcalóides emetina e cefaelina (isolados de *Cephalis ipecacuanha*), a salicilina (obtida das cascas da *Salix alba* L.), entre tantos outros (YUNES e CECHINEL FILHO, 2002).

A era dos antibióticos ocorreu durante e após a Segunda Guerra Mundial, devido aos efeitos antibacterianos que eram exercidos por um grande número de produtos naturais isolados das espécies *Penicillium*, *Streptomyces* e *Cephalosporium*. No período pós-guerras, foram feitas poucas descobertas de novos medicamentos, exceto a descoberta da reserpina, isolada de espécies de *Rauwolfia* Gled., que deu início a era dos tranquilizantes, e a descoberta da vinblastina e vincristina, obtidas do *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, efetivos na quimioterapia do câncer (PHILLIPSON, 2001).

Após este período, o impacto da fitoquímica na descoberta de novos medicamentos diminuiu e a indústria farmacêutica se voltou para o desenvolvimento de produtos químicos sintéticos, através da formação de equipes multidisciplinares que levaram ao desenvolvimento de alguns fármacos como o atenolol, salbutamol e o captopril. Entretanto, na década de 80, o interesse da indústria farmacêutica se voltou novamente aos produtos naturais, levando ao desenvolvimento de fármacos importantes, como a ciclosporina A, a artemisina, a acarbose, o Taxol® (paclitaxel), a fluvastatina, e muitos outros que ainda são utilizados (PHILLIPSON, 2001; YUNES e CECHINEL FILHO, 2002).

Entre os anos de 1989 e 1994, cerca de 200 medicamentos que foram aprovados pela agência americana de controle de medicamentos e alimentos, o FDA, era proveniente de fontes naturais. No ano de 1998, 10 dentre os 20 medicamentos mais vendidos também foram desenvolvidos a partir de produtos naturais. Cerca de 70% das drogas anticancerígenas e dos antibióticos foram obtidos a partir de produtos naturais. Não obstante, os produtos naturais também são utilizados como matéria-prima para a síntese de novas moléculas com ação terapêutica, e, também, como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos, através da modelagem molecular (CALIXTO, 2002).

Outrora, a população de países pobres e em desenvolvimento, não tem acesso à medicina moderna para o tratamento das suas enfermidades, recorrendo à medicina tradicional, em especial, às plantas medicinais, para o alívio de muitas doenças. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 30 a 50% de todos os medicamentos utilizados na China são obtidos a partir de drogas de origem vegetal. Na Alemanha esse índice chega a 90%, e cerca de 50% da população européia e norte-americana já fizeram uso de medicamentos fitoterápicos. A própria OMS reconhece e estimula o uso de plantas medicinais pela população, mas recomenda cuidados especiais no seu uso, orientando estudos científicos para a confirmação da sua segurança e eficácia clínica (CALIXTO, 2002; WHO, 2003).

Com o isolamento e utilização de alguns produtos naturais, como a morfina e a quinina, houve um declínio na utilização dos extratos das plantas, que foram substituídos pelos princípios ativos isolados. Porém, vários estudos demonstram que o extrato da planta pode ser muitas vezes mais efetivo do que a substância isolada, justamente pelo fato de existirem outros compostos na planta, que podem estar

presentes em menor quantidade, mas que, atuando juntamente, resultam em um aumento da atividade farmacológica (PHILLIPSON, 2001).

Neste contexto, surgiram os medicamento fitoterápicos, que são preparações padronizadas contendo extratos de uma ou mais plantas. Segundo a OMS, os medicamentos fitoterápicos são substâncias ativas presentes na planta como um todo, ou em parte dela, na forma de extrato total ou processado. Uma característica destes medicamentos é o fato de que, na grande maioria, os constituintes químicos responsáveis pela atividade farmacológica não são conhecidos, sendo possível que a interação das inúmeras moléculas presentes no extrato proporcione a ação terapêutica que o fitoterápico apresenta (CALIXTO, 2002; WHO, 2008).

O mercado mundial de fitoterápicos apresentou um aumento expressivo nas ultimas décadas, principalmente nos países industrializados, movimentando cerca de 22 bilhões de dólares por ano. Existem várias razões que levaram a este crescimento, como a preferência da população pelas terapias naturais, os menores custos para o consumidor dos medicamentos fitoterápicos, menores efeitos colaterais quando comparados aos medicamentos sintéticos, entre outros fatores que estão levando ao crescimento acelerado deste mercado e, conseqüentemente, ao interesse das grandes indústrias farmacêuticas (CALIXTO, 2002; PINTO *et al.*, 2002).

No Brasil, foram implementadas diversas políticas para promover o uso de medicamentos fitoterápicos pela população. Em 2006, com a Portaria nº 971, foi criada a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), promovendo a institucionalização de algumas práticas de saúde no SUS, como a Homeopatia, Plantas Medicinais e Fitoterapia, Medicina Tradicional Chinesa (MTC/acupuntura) e Termalismo (uso de águas para tratamento de saúde). Neste mesmo ano, o Ministério da Saúde criou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), aprovada pelo Decreto nº 5813, contemplando diretrizes que vão além das esferas do setor Saúde e engloba toda a cadeia produtiva de plantas medicinais e produtos fitoterápicos. Por meio das ações advindas desta política o governo, em parceria com a sociedade, busca garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (PORTAL DA SAÚDE, 2012).

Em 2009, surge a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS, a RENISUS, uma lista contendo cerca de 71 espécies, nativas e exóticas adaptadas, que são amplamente utilizadas pela população brasileira, mas que precisam de estudos para confirmar sua segurança, eficácia, definição da indicação de uso, forma farmacêutica mais adequada, cultivo e produção, tendo por finalidade estimular e orientar as pesquisas com estas plantas, promovendo desenvolvimento e inovação na área de plantas medicinais e fitoterápicos. A RENISUS também auxiliou na elaboração da Relação Nacional de Fitoterápicos (RENAFITO) e da Relação Nacional de Plantas Medicinais e Espécies vegetativas ou exóticas adaptadas na região (RENAPLAM), que foram implementadas em 2010 pelo Ministério da Saúde, visando disponibilizar para o usuário do SUS fitoterápicos ou plantas medicinais que atendam alguns critérios, como o seu uso na atenção básica; disponibilidade de um grande número de evidências de segurança e eficácia; espécies com ampla distribuição pelos biomas brasileiros; que não estejam ameaçadas de extinção, entre outros (PORTAL DA SAÚDE, 2012). Alguns dos fitoterápicos que estão presentes nestas listas são: a espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek), o guaco (*Mikania glomerata* Spreng.) e a cáscara-sagrada (*Rhamnus purshiana* DC.).

O interesse pelos medicamentos fitoterápicos possibilitou o surgimento de estudos biológicos e clínicos, que vêm sendo publicados em revistas internacionais, visando a confirmação de suas eficácias clínicas, qualidade e segurança. Um estudo realizado em 2009 avaliou 24 extratos preparados a partir de 12 plantas que são utilizadas na medicina tradicional brasileira para a cicatrização de feridas, como *Piper regnellii* DC. (a pariparoba) e *Galinsoga parviflora* Cav (o picão-branco). Neste estudo, foram realizados diversos ensaios biológicos para confirmar a efetividade destes extratos e avaliar a citotoxicidade dos mesmos. Como resultado, todos os extratos apresentaram atividade em pelo menos um ensaio biológico, confirmando o seu uso popular, ou seja, a sua atividade cicatrizante. Entretanto, alguns exibiram certo grau de citotoxicidade, o que pode causar certa restrição na sua utilização pela população, exigindo que mais estudos sejam feitos para avaliar este dado (SCHMIDT *et al.*, 2009). Por este motivo é que se faz necessário comprovar a atividade das plantas medicinais, assim como, sua toxicidade, garantindo à população um uso seguro destes produtos.

Os órgãos governamentais recomendam o estabelecimento da fitoterapia como um recurso terapêutico para atender as necessidades básicas dos serviços de

saúde, desde que os parâmetros de eficácia e segurança sejam atendidos conforme preconiza a lei do país (SOUZA *et al.*, 2003). No Brasil, a RDC nº14 de 2010, regulamenta o registro de medicamentos fitoterápicos. Portanto, a partir desta data, o fitoterápico é considerado como um medicamento, devendo cumprir o exposto na lei para que possa ser comercializado, como a elaboração de um relatório técnico (contendo o nome da planta, a parte utilizada, o layout da bula), um relatório de produção e controle de qualidade e um relatório de eficácia e segurança (com ensaios pré-clínicos e clínicos de segurança e eficácia). Todos estes requisitos são exigidos para que se possa garantir a segurança, eficácia e qualidade destes medicamentos para a população, itens fundamentais para a prescrição dos mesmos pela classe médica (ANVISA, 2012; BRASILSUS, 2012).

Existem inúmeras dificuldades para garantir a qualidade e a estabilidade dos medicamentos fitoterápicos, por este motivo a tendência vigente é o cultivo adequado das plantas medicinais, fator essencial para manter a qualidade da matéria-prima e do produto final acabado. Técnicas modernas de biologia molecular poderão trazer grande progresso na seleção de plantas que sejam ricas em princípios ativos de interesse para a produção de medicamentos fitoterápicos. Além disso, os países em desenvolvimento, muitos com uma rica biodiversidade, como o Brasil, devem ter um esforço redobrado para garantir a propriedade intelectual sobre as plantas medicinais e os medicamentos fitoterápicos, podendo assim aproveitar os seus recursos naturais infindáveis na produção de novos medicamentos (CALIXTO, 2002).

Em um fitoterápico, como já foi exposto acima, normalmente não se conhece qual ou quais são os constituintes químicos responsáveis pelos seus efeitos farmacológicos, mas sabe-se que a grande maioria destes são os metabólitos secundários do vegetal.

3.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

O conjunto de reações químicas que continuamente estão ocorrendo em cada célula é denominado de metabolismo. A presença de enzimas específicas direciona estas reações, estabelecendo as chamadas rotas metabólicas, e os

compostos químicos que são formados são denominados de metabólitos. Vegetais, micro-organismos e, em menor escala, animais, possuem dois tipos de metabolismos: o metabolismo primário, onde ocorrem reações que visam o aproveitamento dos nutrientes para fornecer energia (ATP), poder redutor (NADPH), e a biossíntese de substâncias essenciais para sua sobrevivência (as macromoléculas celulares); e o metabolismo secundário, que gera produtos que não são essenciais para o organismo produtor, mas garantem vantagens para sua sobrevivência e perpetuação da espécie. Uma característica muito valiosa dos vegetais reside no fato de que eles possuem uma elevada capacidade biossintética de metabólitos secundários, tanto em relação ao número, quanto a sua diversidade numa mesma espécie (SANTOS, 2007).

Os metabólitos secundários podem atuar na defesa da planta contra herbívoros e micro-organismos, na proteção contra raios UV, na atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes, em alelopatias e muito mais. Estas substâncias também possuem importância comercial na área alimentar, da perfumaria, agrônômica, e farmacêutica, pois um grande número destas substâncias exibe atividade farmacológica. Por este motivo, os metabólitos secundários vêm despertando o interesse de pesquisadores de vários campos da ciência, uma vez que podem ser uma fonte promissora de novas moléculas potencialmente úteis ao homem (COSTA, 2002; SANTOS, 2007).

Dentre as diversas classes de metabólitos secundários que existem, os polifenóis e os óleos essenciais vêm sendo muito estudados, devido às características químicas e biológicas que estes compostos apresentam.

3.2.1 Polifenóis

Os compostos fenólicos compreendem o maior grupo de metabólitos bioativos no reino vegetal. São compostos químicos caracterizados pela presença de um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados e/ou seus derivados funcionais, como ésteres, glicosídeos, metoxilas e outros. Esta classe é constituída pelos compostos fenólicos simples, cumarinas, taninos, flavonóides,

antraquinonas, naftoquinonas, ligninas e lignanas, antocianidinas e antocianinas (EVANS, 1996).

Nas plantas eles são constituintes muito importantes e apresentam diversas funções, como: defesa contra predadores, caracterizadores do odor, da pigmentação e do sabor dos vegetais (COWAN, 1999). Para o homem, estes compostos também são importantes, pois são utilizados na indústria alimentícia como flavorizantes, aromatizantes e antioxidantes; na alimentação e em vinhos e chás, devido ao sabor adstringente, além do seu uso para fins medicinais (EVANS, 1996; HARBONE e DEY, 1997).

Muitas plantas medicinais apresentam um elevado número de compostos fenólicos, e, muitas vezes, eles estão relacionados com suas atividades terapêuticas, como atividade anti-inflamatória, antifúngica e antioxidante. Dentro deste grupo de compostos, podemos citar os taninos e os flavonóides, duas classes encontradas em grande abundância em muitas espécies de plantas medicinais e, normalmente, relacionadas com as respectivas atividades farmacológicas (ARAUJO *et al.*, 2008).

3.2.1.1 Taninos

Os taninos são substâncias fenólicas solúveis em água, classificados segundo sua estrutura química em dois grupos: taninos hidrolisáveis, caracterizados por um poliol central cujas funções hidroxilas são esterificadas com o ácido gálico, e os taninos condensados, que são oligômeros e polímeros formados pela condensação de duas ou mais unidades de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol. Estas substâncias são amplamente distribuídas no reino vegetal, mas as duas classes seguem padrões diferentes: taninos condensados ocorrem amplamente em angiospermas e gimnospermas, já os taninos hidrolisáveis ocorrem em dicotiledôneas herbáceas e lenhosas, dentro de limites taxonômicos bem definidos (SANTOS e MELLO, 2007).

São responsáveis pela adstringência de muitos frutos, vinhos, chás e outras bebidas, e também apresentam a habilidade de formar complexos insolúveis em água com alcalóides, gelatina e outras proteínas. Esta complexação entre taninos e

proteínas é a base para as suas propriedades e para seus principais usos industriais, como na manufatura do couro. Na planta, seu papel biológico está relacionado com a defesa química contra o ataque de herbívoros e micro-organismos patogênicos. (COSTA, 2002).

As plantas ricas em taninos são utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de diversas enfermidades, como diarreia, feridas, problemas estomacais, processos inflamatórios, reumatismo, entre outros. Devido ao seu vasto uso popular, nas últimas décadas, vários grupos de pesquisadores têm investigado as atividades biológicas dos taninos, como ação bactericida e fungicida, antiviral, moluscicida, inibição de enzimas, ação antitumoral e antioxidante (SANTOS e MELLO, 2007). Outros estudos confirmaram a ação de alguns grupos de taninos no metabolismo do ácido araquidônico, tendo uma ação anti-inflamatória, analgésica, e antiúlcera muito importante (ARAUJO *et al.*, 2008).

Três características gerais que são comuns aos dois grupos de taninos podem estar relacionadas com suas atividades farmacológicas: a complexação com íons metálicos; a capacidade de atuar como seqüestradores de radicais livres e atividade antioxidante e a habilidade de complexar com outras moléculas, como as proteínas e polissacarídeos. Esta última característica está diretamente relacionada com a capacidade que os taninos exibem em auxiliar nos processos de cicatrização de feridas, queimaduras e inflamações, motivo pelo quais muitas plantas medicinais ricas em taninos são utilizadas pela população (SANTOS e MELLO, 2007; ARAUJO *et al.*, 2008).

3.2.1.2 Flavonóides

Os flavonóides constituem um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Eles encontram-se amplamente distribuídos no reino vegetal, presentes em abundância e com enorme diversidade estrutural nas angiospermas (ZUANAZZI, 2007).

A maioria dos representantes desta classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, que estão dispostos em duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas, chamados de anéis A, B e C, formando assim o

núcleo 2-fenil-benzopirano. Devido ao grande número de flavonóides existentes, eles são agrupados em classes de acordo com suas características químicas e biossintéticas, dentre as quais podemos citar as flavonas e os flavonóis, os isoflavonóides e as antocianidinas (COSTA, 2002). As propriedades que são apresentadas pelos flavonóides estão diretamente relacionadas com suas características estruturais (Figura 1), entre as quais podemos citar a presença de um grupamento hidroxila na posição 3 do anel C; a dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 do anel C; presença de um grupo carbonila na posição 4 do anel C; o padrão e número de hidroxilas presentes nos anéis A, B e C; atividade quelante pela associação do grupo carbonila do carbono 4 e uma hidroxila no carbono 3 ou 5 e a presença de açúcares (FILHO, SILVA e BOVERIS; 2002).

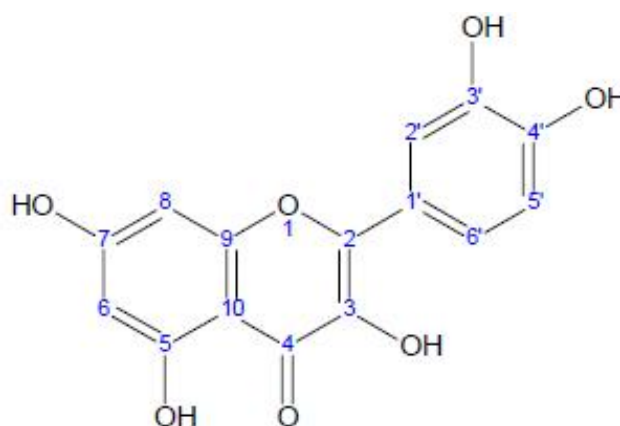


FIGURA 1 – NÚCLEO FUNDAMENTAL DE UM FLAVONÓIDE E SUA NUMERAÇÃO
FONTE: ZUANAZZI (2007)

Na planta, os flavonóides atuam na proteção contra a incidência de raios ultravioleta e visível, além da proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; na atração de polinizadores; no controle da ação de hormônios vegetais; como agentes alelopáticos e antioxidantes. Economicamente, estes compostos são importantes devido às cores que esses pigmentos possuem, sendo utilizados na manufatura do cacau, na tanagem do couro, além de contribuírem com a nutrição e o sabor dos alimentos (ZUANAZZI, 2007).

Os flavonóides constituem o grupo mais representativo de antioxidantes vegetais, e esta propriedade têm atraído a atenção para a nutrição preventiva, pois eles protegem os constituintes alimentares contra os danos oxidativos. Além disso, por apresentarem este elevado potencial antioxidante, eles podem contribuir na

prevenção de diversas patologias, como doenças cardiovasculares, envelhecimento, cânceres, entre outras enfermidades. A biodisponibilidade plasmática e celular se tornam parâmetros extremamente importantes a serem considerados na avaliação do impacto biológico dos diferentes tipos de flavonóides. Na natureza, eles são encontrados normalmente na forma glicosídica, portanto, para que ocorra a absorção intestinal destes compostos em nosso organismo, eles devem ser primeiramente hidrolisados. Alguns fatores adicionais podem afetar a solubilidade e, conseqüentemente, sua absorção, como o etanol e as fibras. Detalhes sobre a absorção, a biodisponibilidade e o metabolismo dos flavonóides na concentração normalmente ingerida da dieta humana ainda não são conhecidos, mas acredita-se que eles não apresentam toxicidade. Todos estes fatores devem ser levados em consideração quando da utilização de flavonóides através de uma dieta rica nestes compostos (FILHO, SILVA e BOVERIS; 2002).

O emprego dos flavonóides na terapêutica é vasto e ainda empírico, mas muitos ensaios *in vivo* e *in vitro* vêm comprovando e determinando a ampla variedade das atividades biológicas destes compostos. Muitos medicamentos contêm flavonóides e são indicados para o tratamento de doenças circulatórias, na hipertensão e agindo como co-fator da vitamina C. Pesquisas relatam alguns dos efeitos dos flavonóides sobre os sistemas biológicos, como: ação anticancerosa considerável; ação anti-viral; anti-hemorragica; anti-inflamatória e de efeito vasodilatador; ação antialérgica; anti-hepatotóxica; antiulcerogênica e atuação anti-plaquetária. Pesquisas recentes demonstraram que alguns flavonóides atuam na inibição da replicação viral do agente causador da Síndrome da Imunodeficiência Humana, o HIV. Atividade hipolipidêmica, inibição de processos relacionados com o início da aterosclerose e aumento de atividade de receptores de LDL também foram descritas para este grupo de metabólitos secundários (LOPES *et al.*, 2000; COSTA, 2002; ZUANAZZI, 2007; ARAUJO *et al.*, 2008).

A grande maioria destes efeitos terapêuticos que os flavonóides exibem está relacionados com sua elevada capacidade antioxidante. Atuam principalmente como sequestradores de espécies reativas de oxigênio (ERO), sendo inibidores da lipoperoxidação *in vitro* no estágio da propagação, onde atuam como bloqueadores das reações em cadeia provocadas pelos radicais hidroxil ($\cdot\text{OH}$) e peroxil ($\text{ROO}\cdot$). Também atuam como sequestradores do ânion radical superóxido e do peroxinitrito (ONOO^-), e como quelantes de cátions divalentes. Todas estas propriedades dos

flavonóides podem explicar os estudos epidemiológicos e clínicos que foram realizados e demonstraram uma significativa correlação inversa entre o consumo de flavonóides e a mortalidade por doenças cardiovasculares (FILHO, SILVA e BOVERIS; 2002).

Portanto, as diversas propriedades dos compostos fenólicos presentes em plantas medicinais estimulam este estudo, uma vez que a busca por fitoterápicos que exibam potenciais atividades terapêuticas pode ser direcionada pela presença elevada destes constituintes nos extratos de uma planta, proporcionando a descoberta de terapias alternativas para o tratamento de diversas enfermidades.

3.2.2 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais, também denominados óleos etéreos (pela solubilidade em solventes orgânicos apolares) ou essências (pelo aroma agradável e intenso), são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas, líquidas e com densidade menor do que a da água (SIMÕES e SPITZER, 2007; BAKKALI *et al.*, 2008). Estas substâncias são formadas pelo metabolismo secundário das plantas aromáticas através de duas vias metabólicas diferentes, que vão dar origem às duas classes químicas que constituem os óleos essenciais: os terpenóides e os fenilpropanóides (EVANS, 1996; SIMÕES e SPITZER, 2007).

Os terpenóides são sintetizados por duas vias distintas (Figura 2): a via do Ácido Mevalônico (MVA), que ocorre no citoplasma, e pela via do Metil Eritritol Fosfato (MEP), que ocorre nos cloroplastos e outros plastídeos. Ambas as vias resultam na síntese dos isoprenos (unidades de cinco carbonos): isopentenil difosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP). A união destas moléculas leva a formação do geranil difosfato (GPP), com dez carbonos, a partir do qual são formados os monoterpenos. O GPP pode ligar-se a outra molécula de IPP, dando origem aos sesquiterpenos (15 carbonos), e, com a adição de outras moléculas de IPP, ocorre a formação dos diterpenos (20 carbonos), triterpenos (30 carbonos) e tetraterpenos (40 carbonos) (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Estes compostos podem ainda sofrer diferentes reações químicas, como oxidação, isomerização, redução, conjugação, entre outras, podendo assim dar

origem às mais diferentes moléculas, o que torna os terpenóides o maior grupo de produtos naturais e diversidade química, estando presentes em maior proporção nos óleos essenciais (BIASI e DESCHAMPS, 2009).

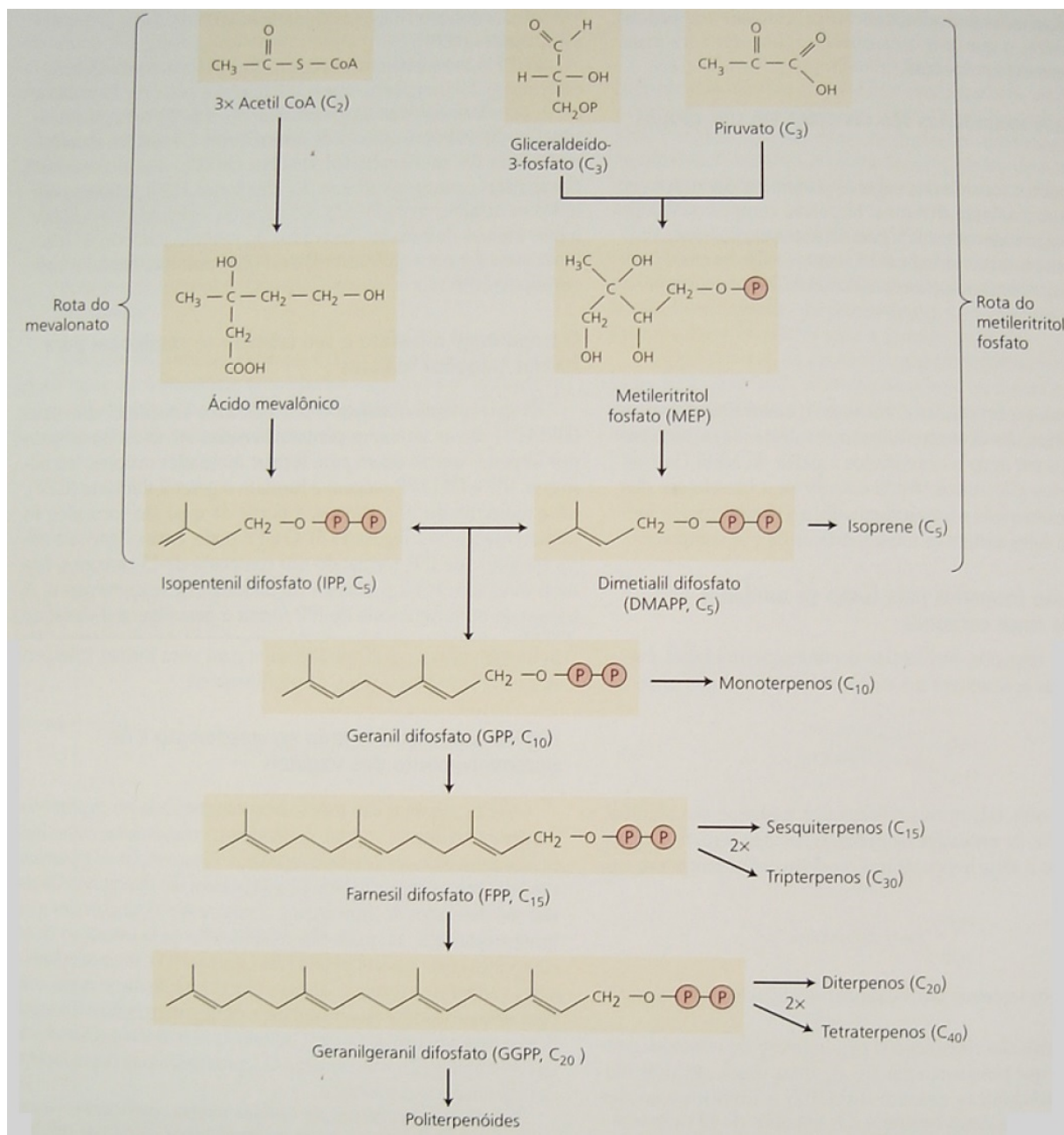


FIGURA 2 – ESQUEMA DA BIOSÍNTESE DOS TERPENOS
 FONTE: TAIZ e ZEIGER (2004)

Por sua vez, os fenilpropanóides são sintetizados a partir da produção de aminoácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina) pela via do ácido chiquímico. Esta rota do ácido chiquímico não é encontrada em animais, somente nas plantas,

bactérias e fungos. Nos animais não ocorre a síntese dos aminoácidos aromáticos, sendo então nutrientes essenciais na sua dieta (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Os fenilpropanóides não são constituintes muito comuns em óleos essenciais, mas algumas espécies possuem proporções significativas destes compostos. Além disso, eles podem ser de extrema importância para conferir o odor e sabor característico de algumas espécies aromáticas. Podemos citar como exemplos o metil-eugenol e metil-cavicol (principais constituintes do óleo essencial de *Ocimum selloi*), metil-cinamato, cavicol e o eugenol (BIASI e DESCHAMPS, 2009).

Os óleos são constituídos por misturas de 20 a 60 componentes, com concentrações variadas, caracterizados por dois ou três compostos principais de concentração entre 20 a 70 % e outros elementos, em menor porcentagem, chamados traços. Estas moléculas encontradas em maior concentração são geralmente determinantes das propriedades biológicas dos óleos essenciais (BAKKALI *et al.*, 2008).

Na planta, os óleos essenciais são armazenados em estruturas secretoras que podem ser internas, como as células parenquimáticas diferenciadas, as bolsas esquizógenas ou lisígenas e os canais oleíferos, ou externas, no caso dos tricomas glandulares (COSTA, 2002). As estruturas secretoras podem ser encontradas em diferentes órgãos das plantas aromáticas, portanto o óleo essencial pode ser obtido a partir das flores; como na calêndula (*Calendula officinalis* L.), na lavanda (*Lavandula officinallis* L.) e na camomila (*Matricaria recutita* L.). A partir das folhas, como na menta (*Mentha sp* L.), no capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) e no eucalipto (*Eucalyptus sp.* L'Hér.). Alguns óleos essenciais podem estar presentes nos frutos; como da erva-doce (*Pimpinella anisum* L.), nas sementes; por exemplo, na noz-moscada (*Myristica fragrans* Houtt.), nos caules; cujo principal exemplo é o óleo essencial obtido das canelas (*Cinnamomum zeylanicum* Blume), e, até mesmo, nas raízes e rizomas, como no vetiver (*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash) e gengibre (*Zingiber officinalis* Roscoe). De acordo com o órgão e o estágio de desenvolvimento da planta, podem ocorrer variações no teor e na composição do óleo essencial (BIASI e DESCHAMPS, 2009).

Diversas são as funções que os óleos essenciais podem exercer no vegetal, atuando como inibidores da germinação, protetores contra predadores (devido as suas ações antibacterianas, antivirais, antifúngicas e inseticidas, além de reduzir o

apetite dos herbívoros por estas plantas), na atração de polinizadores e, também, como protetores contra a perda de água e contra o aumento da temperatura (SIMÕES e SPITZER, 2007; BAKKALI *et al.*, 2008).

Existem diferentes métodos que podem ser utilizados para a extração de óleos essenciais, a escolha depende do valor comercial do produto e do órgão da planta em que ele se concentra. Ademais, o produto da extração pode variar na sua qualidade, quantidade e composição devido a diversos fatores como o clima e a composição do solo onde a planta foi cultivada, o órgão da planta do qual ele é extraído, a idade e o estágio do ciclo vegetativo que ela se encontra (MASOTTI *et al.*, 2003; ANGIONI *et al.*, 2006).

Um dos métodos mais utilizados é a hidrodestilação, principalmente para avaliação do rendimento de óleo essencial em laboratório e para a produção em pequena escala, aonde é empregado o aparelho do tipo Clevenger. As principais consequências da utilização deste método são: a difusão do óleo essencial e água aquecida através das membranas, a hidrólise de componentes do óleo essencial e a decomposição devido à alta temperatura. Devido às características químicas dos constituintes do óleo essencial, como alta volatilidade e baixa estabilidade em condições de altas temperaturas, além da exigência do mercado consumidor, foi desenvolvido o método de extração por fluído supercrítico. Com esta metodologia é possível obter um produto isento de solventes e com integridade dos constituintes do óleo essencial, já que a extração ocorre em condições brandas. Outra técnica ainda utilizada é a *enfleurage* (enfloração), que é útil para a extração do óleo essencial de espécies aromáticas com alto valor comercial e baixo rendimento. A extração por solventes orgânicos e “head space” são pouco empregadas. Já a prensagem a frio é muito utilizada na extração de óleos essenciais de frutos cítricos, como a laranja e o limão (BIASI e DESCHAMPS, 2009).

Os óleos essenciais são conhecidos pelas diversas propriedades que eles exibem, como medicinais, antissépticas (por possuir atividade bactericida, fungicida e antiviral) e pelas suas fragrâncias. Estas propriedades chamaram a atenção das indústrias, promovendo a sua utilização na preservação de alimentos, na perfumaria e como remédios, uma vez que são detentores de atividades antimicrobianas, analgésicas, sedativas, anti-inflamatórias, anestésica local e espasmolíticas. Nos dias de hoje, este cenário não mudou, exceto pelo fato que se conhece um pouco

mais sobre os seus mecanismos de ação, especialmente na questão antimicrobiana (BAKKALI *et al.*, 2008).

Em 2008, já eram conhecidos cerca de 3000 óleos essenciais, sendo aproximadamente 300 com importância comercial, principalmente para as indústrias farmacêuticas, agrônômicas, de alimentos, de domissanitários, de perfumes e de cosméticos, devido ao seu uso, ou de seus componentes, em produtos de maquiagem, em perfumes, preparações dentais, na agricultura, como aditivos ou preservativos em alimentos, e, como remédios naturais (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997, BAKKALI *et al.*, 2008). Também são muito utilizados na aromaterapia, aonde podem ser empregados internamente por inalação através do sistema respiratório; quando diluídos, internamente por ingestão e, externamente pela pele através de banhos, massagens, fricções e aplicações (LAVABRE, 1992).

Como possuem um grande número de constituintes, os óleos essenciais não possuem alvos celulares específicos (CARSON, MEE e RILEY, 2002), e, como são substâncias de caráter lipofílico, eles conseguem passar pela parede celular e membrana citoplasmática, destruindo a estrutura dos polissacarídeos, lipídeos e fosfolipídios, o que provoca um dano à membrana, fator responsável, em parte, pela citotoxicidade que eles apresentam. Nas células eucarióticas, os óleos essenciais podem provocar uma despolarização das membranas mitocondriais, afetando diversos canais iônicos, reduzindo o gradiente de pH, além de alterar a fluidez das membranas, permitindo assim a entrada de radicais, citocromo C, proteínas e íons, levando a morte da célula por apoptose e necrose (BAKKALI *et al.*, 2008).

No geral, a citotoxicidade dos óleos essenciais é, principalmente, devido a presença dos seguintes compostos: aldeídos, fenóis e álcoois (BRUNI *et al.*, 2003; SACCHETTI *et al.*, 2005). Esta propriedade citotóxica é de grande importância nas aplicações dos óleos essenciais, não somente pelo fato de poderem agir contra uma gama de patógenos humanos, animais e parasitas, mas também para a preservação de produtos marinhos e agrícolas. Pelo fato de agirem em vários alvos ao mesmo tempo, ainda não houve relatos de resistência ou adaptação aos óleos essenciais (BAKKALI *et al.*, 2008). Em muitos estudos realizados, a maioria dos óleos essenciais apresentou citotoxicidade sem ser mutagênico, o que leva a conclusão de que eles provavelmente são desprovidos de carcinogenicidade. No entanto, alguns óleos ou alguns dos constituintes destes podem sofrer uma ativação metabólica, tornando-os agentes cancerígenos secundários (GUBA, 2001).

A possibilidade de moderar a resposta da célula a um agente mutagênico particular através do uso de substâncias naturais abre novos horizontes no controle do câncer. Como as células tumorais usam múltiplos percursos de sobrevivência das células para prevalecer, e, como os terpenos, constituintes dos óleos essenciais, podem suprimir diversos percursos ao mesmo tempo, isto os torna potenciais agentes para o tratamento e prevenção do câncer (KOROCH, JULIANI e ZYGADLO, 2007). Existem também relatos de que sesquiterpenos e monoterpenos podem potencializar a atividade anticancerígena de alguns medicamentos convencionais, como o paclitaxel e a doxorrubicina. Outra forma de atuação dos óleos é na proteção de sistemas do nosso organismo da toxicidade de alguns medicamentos (ADORJAN e BUCHBAUER, 2010).

Na sua composição, os óleos essenciais apresentam compostos com características antioxidantes, fato que impulsionou vários estudos na avaliação *in vitro* da atividade antioxidante de óleos essenciais (BAKKALI *et al.*, 2008). Muitos óleos essenciais exibiram uma capacidade antioxidante maior que a dos seus respectivos extratos, principalmente quando possuíam uma constituição rica em polifenóis, como o eugenol e o timol. Este dado levou a conclusão de que os polifenóis são mais responsáveis pela atividade antioxidante dos óleos essenciais do que os terpenos (ADORJAN e BUCHBAUER, 2010), uma vez que os compostos fenólicos são multifuncionais, podendo agir como agentes redutores e doadores de hidrogênio, promovendo ação antioxidante (KOROCH, JULIANI e ZYGADLO, 2007).

Muitos estudos já foram realizados confirmando a ação anti-inflamatória dos óleos essenciais, assim como, de componentes isolados de determinados óleos, a timoquinona, o borneol, entre outros. Em alguns ensaios, foi possível verificar a ação destas substâncias reduzindo a síntese dos principais mediadores da inflamação, como interleucinas (IL-8, IL-1 β), prostaglandina E2 (PGE2) e o fator de necrose tumoral (TNF- α), bem como inativando enzimas-chave deste processo, por exemplo, a ciclooxigenase 2 (COX-2) (ADORJAN e BUCHBAUER, 2010).

Efeitos analgésicos também já foram relatados em estudos com óleos essenciais e seus componentes isolados, demonstrando a ação destes tanto a nível periférico quanto a nível central (SILVA *et al.*, 2003). Em alguns ensaios realizados, o perfil do mecanismo de ação dos óleos essenciais e componentes isolados foi similar ao da morfina, sugerindo que o mecanismo de ação da atividade

antinociceptiva destas substâncias naturais envolveria o sistema opióide (ADORJAN e BUCHBAUER, 2010).

Muitos trabalhos sugerem que a ação digestiva de algumas plantas aromáticas é devida, principalmente, aos seus óleos essenciais (KOROCH, JULIANI e ZYGADLO, 2007). Em vários estudos realizados, foi verificado que os óleos essenciais regulam o processo digestivo antes de a comida chegar ao estômago, agindo por diversos meios: inibindo a motilidade gástrica (antiespasmódicos), induzindo a expulsão de gases do estômago e do intestino (ação carminativa), aumentando a liberação da bile (coleréticos), como antidiarreicos, e, indiretamente, protegendo a função do fígado (hepatoprotetivos) (COELHO-DE-SOUZA, CRIDDLE e LEAL-CARDOSO, 1998; HAJHASHEMI *et al.*, 2000; SADRAEI *et al.*, 2001).

Alguns óleos essenciais têm o potencial de aumentar a penetração transdérmica de drogas, sendo chamados também de promotores de absorção ou aceleradores, uma vez que eles são capazes de penetrar na pele conseguindo reduzir a função barreira da mesma, por meio de vários mecanismos de ação. Estudos envolvendo vários óleos essenciais e medicamentos, como ibuprofeno e nimesulida, foram realizados, comprovando que os óleos podem atuar aumentando a absorção percutânea destas drogas (ADORJAN e BUCHBAUER, 2010).

A atividade antimicrobiana de vários óleos essenciais já é bem conhecida e atribuída à presença de constituintes ativos, como os isoprenos, outros hidrocarbonetos e compostos fenólicos. O caráter lipofílico do esqueleto hidrocarbônico e o caráter hidrofílico dos grupos funcionais são de extrema importância na ação antimicrobiana destes compostos. Podemos encontrar na literatura diversos ensaios comprovando a atividade de óleos essenciais e de seus compostos isolados contra uma gama de micro-organismos, incluindo bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, leveduras e fungos. Porém, o mecanismo de ação destas substâncias é complexo e ainda pouco conhecido, sendo provável que estas propriedades antimicrobianas não sejam atribuídas a um único mecanismo (KOROCH, JULIANI e ZYGADLO, 2007).

Atividade antiviral de óleos essenciais também já foi descrita, alguns exibindo capacidade de inativar o vírus do herpes (HSV-1 e HSV-2) e a sua difusão, outros interferiram na replicação do vírus Influenza, incluindo o subtipo H1N1, na replicação do vírus da febre amarela, poliovírus 1 e adenovírus. Em muitos casos, foi verificado que os óleos essenciais com uma maior concentração de mono e

sesquiterpenos hidrocarbonados tinham maior atividade antiviral do que os com maior concentração de terpenos oxigenados (KOROCH, JULIANI e ZYGADLO, 2007; ADORJAN e BUCHBAUER, 2010).

Óleos essenciais também apresentam propriedades irritantes e repelentes contra o *Aedes aegypti*, o mosquito da malária, espécies de abelhas e mosquitos (ADORJAN e BUCHBAUER, 2010); fototoxicidade (BAKKALI *et al.*, 2008); atividade ansiolítica; podem inibir a reabsorção óssea; alterar o humor, a concentração e o sono; agir como estimulantes do sistema imune e no tratamento do Alzheimer (KOROCH, JULIANI e ZYGADLO, 2007).

Pelo fato de serem misturas complexas, as atividades biológicas dos óleos essenciais podem ser proporcionados por alguns compostos específicos, seus constituintes majoritários, bem como pelo sinergismo entre todas as moléculas, fato evidenciado em muitos estudos aonde o óleo essencial exibiu uma atividade maior do que o seu composto isolado (BAKKALI *et al.*, 2008).

Devido ao grande portfolio de utilização que os óleos essenciais apresentam, existem inúmeros conglomerados internacionais que os negociam, portanto os países que realizam a produção destes produtos têm um importante impacto econômico na sua exportação. No Brasil, a produção de óleos essenciais iniciou-se em meados de 1920, com o extrativismo de essências naturais. Entretanto, o desenvolvimento da indústria de óleos essenciais no nosso país foi impulsionado pela escassez de matérias-primas durante e logo após a Segunda Guerra Mundial (ÓLEOS, 2003). Neste período houve um aumento da demanda da exportação dos óleos de sassafrás (*Ocotea odorífera* Rohwer), menta, pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) e cítricos (*Citrus sp. L.*), favorecendo o Brasil (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

O mercado internacional de óleos essenciais movimenta cerca de 1,8 bilhões de dólares anualmente. No entanto, a participação brasileira nesse mercado é pequena, apenas 0,1%, que está concentrada sobre os óleos cítricos que são subprodutos da produção de suco concentrado de laranja (BIASI e DESCHAMPS, 2009). Mesmo assim, esta participação do Brasil no mercado internacional é importante, pois dentro dos cerca de 300 óleos essenciais de importância comercial, os óleos cítricos, como o da laranja (*Citrus sinensis* L.) e do limão (*Citrus limon* L.), estão entre os principais óleos no mercado mundial (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

Em 2009, o Brasil encontrava-se entre os quatro principais países responsáveis pela produção de óleo essencial, ao lado da Índia, da China e da Indonésia (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009). A grande biodiversidade brasileira coloca o Brasil numa situação muito promissora para aumentar a sua participação futura no mercado de óleos essenciais, mas a composição química da sua flora deve ser mais explorada para que isso se torne realidade. Além das espécies aromáticas nativas, muitas espécies exóticas apresentam grande potencialidade para o cultivo, e a continentalidade do Brasil permite que sejam localizados microclimas favoráveis para o cultivo das mais diversas espécies, desde as de clima tropical até as de clima temperado, incentivando assim o cultivo daquelas que apresentam uma alta demanda mundial dos seus óleos essenciais, como é o caso da menta, do eucalipto, da lavanda, entre outras. Porém, há uma desvantagem nesta diferença climática que existe no Brasil: as espécies aromáticas podem apresentar diferenças no seu desenvolvimento e metabolismo secundário, o que dificulta a definição do seu comportamento (BIASI e DESCHAMPS, 2009).

A produção de óleos essenciais em nosso país é rentável e viável, mas necessita de incentivos governamentais e da formação de parcerias entre Centros de Pesquisa e Universidades com a Iniciativa Privada, pois assim poderão ser desenvolvidas e aplicadas técnicas modernas de cultivo, seleção e melhoramento de plantas, possibilitando a obtenção de produtos com qualidade e preço para disputar o mercado internacional (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

Diante de todos estes grupos de compostos que podem estar presentes em uma planta, e, analisando as inúmeras atividades biológicas que podemos encontrar nestas, tivemos o estímulo que nos conduziu a este estudo, buscando avaliar as atividades biológicas da espécie *Liquidambar styraciflua*, pertencente à família Altingiaceae.

3.4 FAMÍLIA ALTINGIACEAE HORAN

A família Altingiaceae Horan. é constituída por aproximadamente quinze espécies que são divididas em três gêneros: *Liquidambar* L., com quatro a cinco espécies, *Altingia* Noronha, com seis a oito espécies, e *Semiliquidambar* H-T.

Chang, com aproximadamente três espécies. Esta família mostra uma disjunção biogeográfica intercontinental clássica entre Ásia e América do Norte, sendo que a maioria das espécies desta família está presente na Ásia (ICKERT-BOND e WEN, 2006).

As espécies dos gêneros *Altingia* e *Semiliquidambar* são encontradas na Ásia tropical e subtropical, enquanto que as quatro espécies do gênero *Liquidambar* são encontradas tanto na Ásia (duas espécies no leste e uma espécie no oeste) quanto na América do Norte e América Central (uma espécie) (ICKERT-BOND e WEN, 2006).

Na classificação de espécies dentro desta família, são levadas em consideração algumas características taxonômicas tradicionais que também são encontrados nas espécies da família Hamamelidaceae s. str. (BOGLE, 1986). Por isto, os gêneros *Liquidambar*, *Altingia* Noronha e *Semiliquidambar* eram tratados como subfamílias de Hamamelidaceae, ou como Altingioideae (WILLIAMS, 1855; REINSCH, 1890; CHANG, 1979; CRONQUIST, 1981; ENDRESS, 1989; QUI *et al.*, 1998), e, incorretamente, como Liquidambaroideae (HARMS, 1930; BOGLE, 1986; FERGUSON, 1989).

Estudos posteriores foram demonstrando algumas diferenças entre estas famílias, sugerindo uma possível separação, devido à presença de aspectos morfológicos e moleculares diferentes. Vários autores (BLUME, 1828; WILSON, 1905; CHANG, 1964; MELIKIAN, 1973; LI *et al.*, 1988; ZHOU e JIANG, 1990; WANG, 1992) já classificavam Altingiaceae como uma família, separadamente de Hamamelidaceae (SHI *et al.*, 2001), mas foi somente com a publicação da APG (1998), que foi amplamente aceito e reconhecido Altingiaceae e Hamamelidaceae s. str. como famílias distintas, ambas pertencentes a ordem Saxifragales.

As espécies desta família são plantas arborescentes com, na sua maioria, inflorescências unissexuais esféricas ou em forma de concha, cápsulas biloculares, com deiscência septicidal ou loculicidal, muitas sementes por fruto, destas, várias são abortivas, sementes maduras com um anel ou um círculo de distância, sendo que as inflorescências se transformam em infrutescências lenhosas (BOGLE, 1986; FERGUSON, 1989; ENDRESS e IGERSEIM, 1999).

Os três gêneros pertencentes a esta família são muito similares na morfologia de suas folhas, inflorescências, grãos de pólen, frutos, sementes e estípulas, mas

diferem principalmente em algumas características vegetativas e morfológicas (SHI *et al.*, 2001).

O gênero *Altingia* é composto por aproximadamente seis espécies morfológicamente diferentes, e algumas espécies controversas, todas classificadas em duas seções: *Altingia* Noronha, que inclui as espécies *A. chinensis* Oliver ex Hance, *A. obovata* Merrill et Chun, *A. yunnanensis*, *A. poilanei* e *A. excelsa* Hemsley, espécies que possuem numerosos frutos, e a outra seção, nomeada *Oligocarpa* H.-T. Chang, é formada pelas espécies *A. gracilipes* Hemsley e *A. siamensis*, que possuem no máximo nove frutos por infrutescência, menores e hemiesferoidais (CHANG, 1979; FERGUSON, 1989). As espécies de *Altingia* possuem folhas não-lobuladas (SHI *et al.*, 2001).

O gênero *Semiliquidambar* possui aproximadamente três espécies, localizadas no sul e leste da China, que são: *S. cathayensis* H.-T. Chang, *S. caudata* H.-T. Chang e *S. chingii* (Metcalf) H.-T. Chang (ICKERT-BOND e WEN, 2006).

Alguns autores propõem que este gênero seria um híbrido de *Altingia* e *Liquidambar*, uma vez que suas folhas combinam características encontradas nas folhas dos dois gêneros (BOGLE, 1986; FERGUSON, 1989; SHI *et al.*, 2001).

Outro gênero pertencente a esta família, *Liquidambar*, possui como característica a presença de espécies em diferentes continentes, ou seja, uma distribuição intercontinental, uma vez que encontramos espécies no leste da América do Norte, México, leste e sudoeste da Ásia (SHI *et al.*, 2001).

São classificadas dentro deste gênero cerca de cinco espécies, sendo elas *L. acalycina* H.-T. Chang, *L. formosana* Hance, *L. orientalis* Mill., *L. styraciflua* L. , e uma espécie que é reconhecida como *L. styraciflua* var. *mexicana* Oerst. e *L. macrophylla* Oerst. (PIGG, ICKERT-BOND e WEN, 2004). As folhas destas espécies são decíduas, possuindo cerca de três a cinco lóbulos, podendo ser encontradas folhas com até sete lóbulos (SHI *et al.*, 2001).

Ickert-Bond e Wen (2006) publicaram um trabalho em que foi realizada uma investigação na filogenia e biogeografia da família Altingiaceae, através da análise de cinco regiões não codificadas (non-coding) do cloroplasto, e com isto verificaram que Altingiaceae deveria ser constituída de somente um gênero, *Liquidambar*, que tem uma prioridade sobre os outros dois gêneros, além de concluírem que este gênero é parafilético. Alguns estudos anteriores, como o de Shi e colaboradores

(2001), já haviam argumentado esta possível classificação de todas as espécies da família em um único gênero, *Liquidambar*.

3.5 GÊNERO *LIQUIDAMBAR* L.

O gênero *Liquidambar*, Altingiaceae, é o mais conhecido da família, sendo constituído por quatro espécies intercontinentais na zona temperada do hemisfério norte. Duas espécies são encontradas na Ásia oriental (*L. formosana* e *L. acalycina*), uma na Ásia ocidental (*L. orientalis*) e a outra é encontrada entre a América do Norte e América Central (*L. styraciflua*) (ICKERT-BOND, PIGG e WEN, 2005).

O mapa da Figura 3 representa a distribuição geográfica deste gênero.

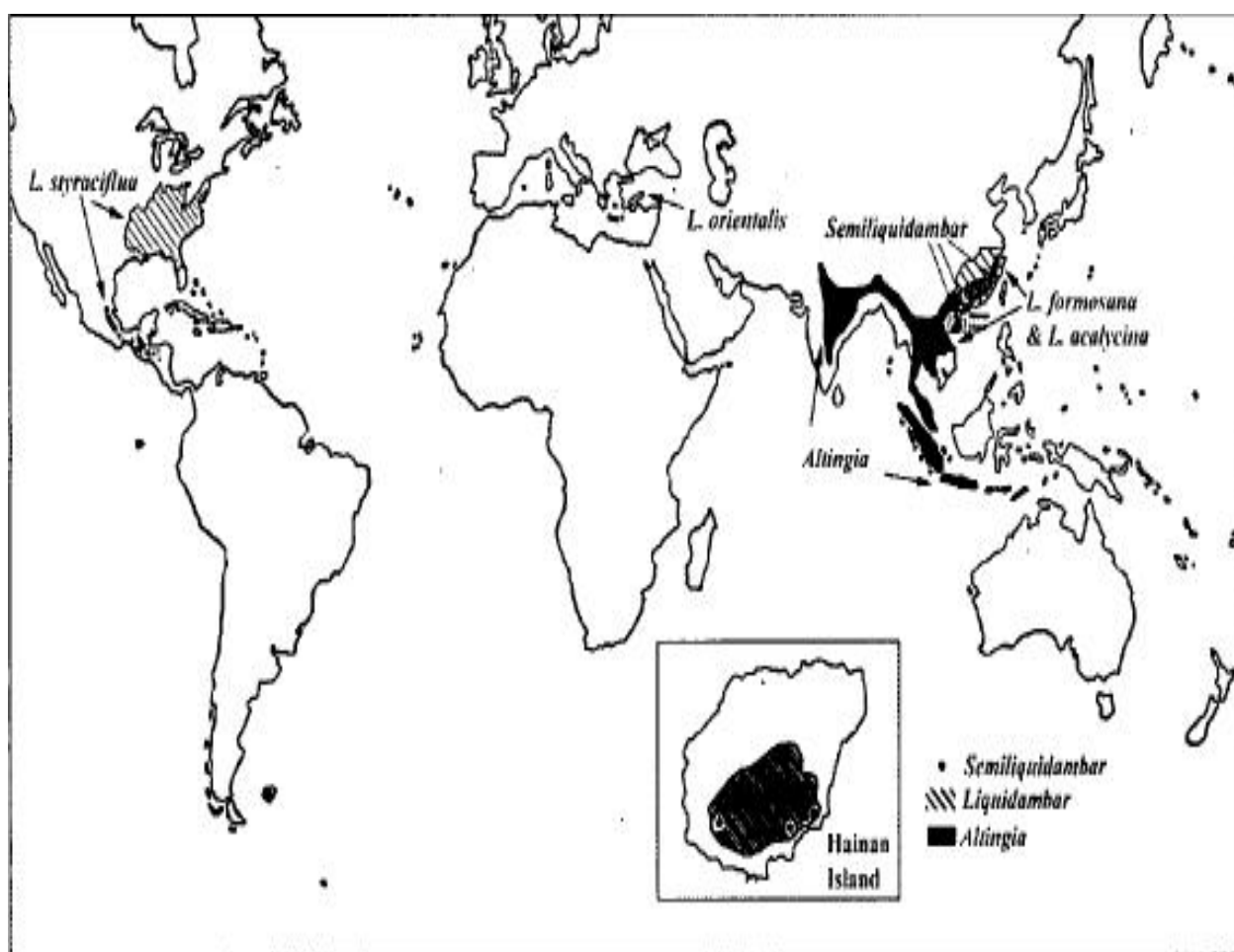


FIGURA 3 – MAPA DA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DOS GÊNEROS *SEMILIQUIDAMBAR*, *LIQUIDAMBAR* E *ALTINGIA*.
FONTE: ICKERT-BOND, PIGG, WEN (2005)

Alguns autores classificam mais uma espécie como parte deste gênero por apresentar variantes morfológicas similares à *L. styraciflua*, sendo encontrada do México até Honduras, e, por isto, nomeada *L. styraciflua* var. *mexicana* Oerst. e *L. macrophylla* Oerst (ERNST 1963; FERGUSON, 1989; ZHANG, ZHANG e ENDRESS, 2003). Morfologicamente, *L. macrophylla* possui folhas e frutos um pouco maiores que as demais espécies deste gênero, e ocorrem em florestas fechadas localizadas a altas altitudes (1000-2300 m) no México, Belize, El Salvador, Honduras, Guatemala e Nicarágua, enquanto que outras espécies, como *L. styraciflua* do leste da América do Norte, estão localizadas no nível do mar até 300m de altitude (ICKERT-BOND e WEN, 2006).

As quatro espécies que fazem parte do gênero *Liquidambar* são amplamente aceitas, mas alguns autores sugerem que *L. styraciflua* e *L. orientalis* sejam conspecíficas devido à mudança gradual contínua das suas características, principalmente em relação às suas folhas, e, por apresentarem diferenças morfológicas sutis entre suas infrutescências. A similaridade entre estas duas espécies pode também ser devida à estase morfológica que ocorre com os gêneros intercontinentais, sendo esta teoria confirmada pelas similaridades morfológicas entre estas duas espécies, apesar de uma grande divergência entre elas no nível molecular (REINSCH, 1890; MEIKLE, 1977; FERGUSON, 1989, WEN 1998, 1999, 2001).

Devido à sua distribuição, este gênero tem sido o foco de vários estudos que analisam as disjunções biogeográficas intercontinentais na zona temperada do norte (WEN, 1999).

Este gênero é formado por espécies arbustivas, com inflorescências esféricas que se transformam em infrutescências unissexuais e globulosas. Estas são constituídas por 25-50 cápsulas biloculares arranjadas helicoidalmente, que vão fornecer várias sementes por fruto, viáveis ou abortivas. Uma característica deste gênero é a presença de estames, que vão produzir o pólen maduro, agrupados em inflorescências separadas, mas também podem ser encontrados vários estames separados com o pólen maduro junto de um pistilo da inflorescência (ICKERT-BOND, PIGG e WEN, 2005).

Os frutos podem ser encontrados conectados um ao outro, formando uma infrutescência coesiva, mas em algumas espécies eles podem estar longe uns dos

outros, desta forma levando à produção de frutos individuais (ICKERT-BOND, PIGG e WEN, 2005).

As principais características usadas para diferenciar as quatro espécies deste gênero são o número de lóbulos e pubescência de suas folhas. As folhas de *L. formosana* e *L. acalycina* possuem usualmente três lóbulos, enquanto que as folhas de *L. styraciflua* e *L. orientalis* possuem de cinco a sete lóbulos (BOGLE, 1986).

Duas seções foram reconhecidas para o gênero: Seção *Euliquidambar* e Seção *Cathayambar* Harms (HARMS, 1930), sendo esta última formada por uma única espécie, *L. formosana* que apresenta como característica diferenciadora das demais espécies a presença de cerdas nas suas inflorescências e infrutescências. As demais espécies, *L. orientalis*, *L. styraciflua* e *L. acalycina*, foram classificadas na seção *Euliquidambar*, por não apresentarem estas estruturas (ICKERT-BOND e WEN, 2006).

A espécie *L. acalycina*, diferentemente das demais, possui muitas características que são encontradas no gênero *Altingia*, principalmente a presença de uma flange circular em volta da semente, enquanto que as demais espécies de *Liquidambar* apresentam um anel distal entre suas sementes (PIGG *et al.*, 2004; ICKERT-BOND *et al.*, 2005).

As espécies deste gênero são bem conhecidas pelas suas exsudações balsâmicas. A resina da espécie *Liquidambar formosana*, conhecida como Liquidambaris resina, já é muito utilizada na medicina chinesa para o tratamento de algumas enfermidades como herpes, úlcera, dor de dente e tumores. Um estudo comprovou que esta resina apresenta na sua composição alguns triterpenóides que exibiram atividade antitumoral e anticoagulativa, explicando a ação desta resina no tratamento das enfermidades relatadas (YANG *et al.*, 2011). Outro estudo realizado por Wang e colaboradores (2010) com esta mesma espécie, mas com os extratos obtidos das suas folhas, revelaram que ela apresenta uma composição rica em polifenóis, como flavonóides e taninos, exibindo uma excelente atividade antioxidante.

Dentro deste gênero, encontramos uma característica importante: todas as espécies são plantas aromáticas, portanto produtoras de óleo essencial. O óleo essencial de *Liquidambar orientalis* foi analisado por CG-MS em um estudo, aonde foram identificados onze compostos, dentro destes, o álcool hidrocínamil e trans-cínamil foram classificados como os majoritários (KIM *et al.*, 2008).

A importância comercial destas espécies está relacionada com a indústria do papel, além de possuírem um elevado potencial como plantas ornamentais. A popularidade das espécies deste gênero é, principalmente, devido à forma agradável das árvores, a sua coloração atraente no outono, folhagem no verão, frutos interessantes, além da sua habilidade em fornecer sombra (DURKOVIC e LUX, 2010).

Estudos fitoquímicos e biológicos com as espécies deste gênero são escassos, o que torna esta pesquisa com a espécie *L. styraciflua* extremamente relevante.

3.5.1 *Liquidambar styraciflua* L.

O Liquidâmbar (*L. styraciflua*) apresenta a seguinte classificação taxonômica (INPI, 2012; TROPICOS, 2012):

Classe: Equisetopsida C. Agardh

Sub-classe: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superordem: Myrothamnanae Takht.

Ordem: Saxifragales Bercht. & J. Presl

Família: Altingiaceae Horan.

Gênero: *Liquidambar* L.

Espécie: *Liquidambar styraciflua* L.

É uma espécie arbórea, folhosa, caducifólia, monóica, com cerca de 20-25 metros de altura (Figura 3), possuindo uma ampla distribuição natural no sul e sudeste dos Estados Unidos (desde Connecticut até o leste do Texas, e desde as partes do sul de Ohio, Indiana e Illinois até a região central da Flórida), estendendo-se até o México e a América Central. Também é conhecida como goma-doce, liquidâmbra ou árvore-de-jacaré (LORENZI *et al.*, 2003; SHIMIZU e SPIR, 2004).

Portanto, trata-se de uma espécie exótica, ou seja, oriunda de outros países ou continentes, não sendo nativa ou indígena. Os estados do sul do nosso país são aqueles que apresentam um cultivo em maior número de espécies exóticas de clima temperado. À semelhança das nativas e indígenas, as árvores exóticas podem ser cultivadas para diversos fins, como ornamental, sombreamento, quebra-vento,

produtos extrativos como a obtenção de frutos, madeiras, resina, sementes oleaginosas ou comestíveis e princípios medicinais (LORENZI *et al.*, 2003).



FIGURA 4 – ASPECTO GERAL DA ESPÉCIE *Liquidambar styraciflua* L.
FONTE: NAKASHIMA (2012)

Alguns estudos já realizados com esta espécie no Brasil informam que ela tem uma grande adaptação no Sul e Sudeste do país (LOEWE MUÑOZ, 1992). Uma característica importante desta árvore é a sua capacidade de se desenvolver em solos úmidos e regiões de ocorrência de geadas, onde a maioria das espécies arbóreas não teria condições de prosperar. Aliás, o Liquidâmbar produz madeira de alta qualidade, tanto para a produção de celulose e papel, quanto para a indústria de madeira serrada e laminada, tornando-o uma espécie alternativa valiosa para plantios florestais no sudoeste do Paraná, com produtividade de madeira de 40m³/ha ano (SHIMIZU e SPIR, 2004; FLORIDATA, 2011).

Outro fator que pode ser levado em consideração é que a indústria madeireira no Brasil utiliza, em grande escala, toras de árvores dos gêneros *Pinus* e *Eucalyptus*, tendo um grande aproveitamento de suas madeiras, evitando o consumo das madeiras nativas. Portanto, o uso de Liquidâmbar pela indústria de

celulose e movelaria em nosso país, pode ser uma alternativa lucrativa, proveitosa, contribuindo com a preservação de novas florestas nativas (ZANON *et al.*, 2009).

L. styraciflua é uma espécie com crescimento relativamente rápido, tendo uma vida média de 200 anos, e atingindo a maturidade reprodutiva com cerca de 20-30 anos de idade. Seu tronco ereto (Figura 5) apresenta cascas pardo-acinzentadas nas plantas jovens, já nas plantas adultas estas cascas são mais escuras e muito fendidas longitudinal e transversalmente (LORENZI *et al.*, 2003; MORRIS *et al.*, 2008).



FIGURA 5 – DETALHES DO TRONCO DE *Liquidambar styraciflua* L.
FONTE: NAKASHIMA (2012)

Sua ramagem é disposta de modo a formar uma copa cônica ou piramidal. As folhas (Figura 6) são simples, alternas, palmatilobadas, com pecíolo longo, 5 a 7 lobos agudos, verde-brilhantes, variando de 6 a 12 cm de comprimento com margens serrilhadas (LORENZI *et al.*, 2003; MORRIS *et al.*, 2008).



FIGURA 6 – DETALHES DAS FOLHAS DE *Liquidambar styraciflua* L.
FONTE: NAKASHIMA (2012)

As inflorescências masculinas e femininas são formadas em setembro-outubro, ocorrem separadas na mesma planta e são do tipo globoso e terminais, levando a produção de flores do meio até o fim da primavera. Seus frutos (Figura 7) são do tipo cápsula globosa, espinescentes, conhecidos também como “gumballs”, formados no outono. Estes, por sua vez, possuem sementes pequenas, aladas, que são comidas ou dispersadas por pássaros e esquilos (LORENZI *et al.*, 2003; MORRIS *et al.*, 2008).



FIGURA 7 – FRUTOS DE *Liquidambar styraciflua* L.
FONTE: TROPICOS (2012)

Pelo fato das suas sementes serem pequenas, elas adquirem alta capacidade de dispersão, podendo atingir distâncias de até 183 metros, facilitando sua dispersão a áreas destinadas a outras culturas. A raiz de Liquidâmbar é do tipo pivotante e profunda, o que torna as árvores resistentes aos ventos, quando cresce em solos profundos. Possui grande capacidade de rebrota, tanto a partir de raízes adventícias, quanto de touças, facilitando a sua propagação vegetativa (SHIMIZU e SPIR, 1999).

Esta espécie recebe este nome, Liquidâmbar, pelo fato de sua casca exsudar do floema uma seiva de cor marrom-clara semelhante ao mel. Esta seiva, quando submetida à fervura, torna-se um bálsamo que é muito utilizado na indústria de perfumes, adesivos e tabaco. Além disso, ela também pode ser utilizada para fins medicinais, como no tratamento do catarro pulmonar, disenteria, doenças da pele, entre outros, principalmente devido à presença de ácido cinâmico e terebentina na seiva (LOEWE MUÑOZ, 1992; MATTOS *et al.*, 2001; SHIMIZU, 2005).

Liquidambar styraciflua é citada como a mais útil dentro das espécies de gomas-doces, ou seja, demais espécies *Liquidambar*, pois é uma árvore adequada ao reflorestamento, pela madeira retilínea e de boa qualidade que produz. Não obstante, ela apresenta um grande efeito ornamental pelas cores outonais amarelas e vermelhas que as suas folhas adquirem no inverno (Figura 8), antes de caírem; e seu tronco exsuda uma goma cor de âmbar que é utilizada em confeitos e para fins medicinais (LORENZI *et al.*, 2003; DURKOVIC e LUX, 2010; FLORIDATA, 2011).



FIGURA 8 – ASPECTO DAS FOLHAS DE *Liquidambar styraciflua* L. NO OUTONO.
FONTE: TROPICOS (2012)

A síntese de ácido chiquímico pelas folhas, cascas e caule e pelas sementes dos frutos de *Liquidambar styraciflua* vem sendo avaliada por alguns estudos. A razão destes estudos consiste no fato de que o ácido chiquímico pode levar a síntese de vários outros compostos bioativos. Um exemplo de composto bioativo que pode ser sintetizado a partir do ácido chiquímico é o inibidor da neuraminidase oseltamivir fosfato 8, droga vendida sob o nome comercial Tamiflu®, que é atualmente o tratamento mais promissor para a gripe aviária, do subtipo H5N1 da gripe A (ABRECHT *et al.*, 2005; WARD *et al.*, 2005; ENRICH *et al.*, 2008).

Em 2008, Enrich e colaboradores avaliaram a produção de ácido chiquímico pelas sementes dos frutos de *L. styraciflua*. Neste estudo, eles verificaram que as sementes abortivas e granulares produzem uma elevada quantidade de ácido chiquímico (6,5% p/p), enquanto que nas sementes desenvolvidas e férteis ele é encontrado em pequenas quantias (0,14% p/p). Ademais, foi possível concluir que a quantidade de ácido chiquímico produzido pelas sementes de Liquidâmbar é semelhante ao produzido pelo fruto de *Illicium verum* (o anis estrelado chinês). Este dado é extremamente importante, pois a maior parte do fornecimento do ácido chiquímico é feito pela extração a partir do fruto de *Illicium verum*. Estes resultados tornam esta espécie, *L.styraciflua*, uma fonte alternativa significativa e viável para a produção de ácido chiquímico devido ao grande número de frutos que são obtidos por árvore, juntamente com os recentes avanços na tecnologia da sua reprodução, garantindo a sua disponibilidade para o futuro.

Martin e colaboradores (2010) realizaram extrações metanólicas com as cascas e o caule de *L. styraciflua*, obtendo valores de 1,4 e 0,2 mg/g de ácido chiquímico, respectivamente. Estes valores que foram obtidos são menores do que os relatados para as suas sementes e folhas (verdes e amarelas), testadas por outros autores. Entretanto, pode-se concluir que todas as partes desta árvore poderiam ser utilizadas para a obtenção de ácido chiquímico, com destaque para as suas sementes, que apresentam uma maior produção desta substância.

Em relação às atividades biológicas já relatadas para esta espécie, encontra-se um estudo realizado por Ohno e colaboradores (2008), aonde verificou-se a capacidade do extrato etanólico da resina de *L. styraciflua* em inibir significativamente a sinalização da Angiotensina II *in vivo*. Neste mesmo estudo, foram isolados dois compostos deste extrato, o benzoato de benzila e o cinamato de benzila, sendo estes os responsáveis pela inibição da função da Angiotensina II, de

maneira dose-dependente, sem citotoxicidade. Como a Angiotensina II está diretamente relacionada com a hipertensão, uma vez que a sua ativação promove a elevação da pressão arterial, a resina desta espécie e outras plantas que apresentarem os compostos benzoato ou cinamato de benzila na sua constituição podem ter potencial terapêutico para o tratamento da hipertensão. Esta aplicabilidade é de grande interesse para a área farmacêutica, pois existem muitos problemas relacionados aos medicamentos disponíveis para o tratamento do paciente hipertenso, levando ao abandono do tratamento por parte destes. Assim sendo, a descoberta de plantas com possível ação terapêutica no tratamento desta enfermidade é de extrema importância, podendo ser uma alternativa aos tratamentos já existentes.

Uma característica muito valiosa desta espécie é o fato de ela ser uma planta aromática, ou seja, uma planta que produz óleo essencial no seu metabolismo secundário. Este óleo essencial apresenta diferentes compostos na sua constituição, e pode possuir diversas funções na planta, além de possíveis atividades terapêuticas. Em 1979, Tattje e Bus fizeram uma análise inicial da composição do óleo essencial extraído das folhas frescas de *L. styraciflua*. Foram identificados três compostos: vitispirano, que pode ser derivado de carotenóides cíclicos (este composto já foi encontrado nos aromas voláteis do suco de uva), valeranona e valerenal, estes dois últimos são normalmente encontrados em espécies da família Valerianaceae. Portanto, se faz necessário mais estudos que identifiquem a constituição total do óleo essencial que é extraído das folhas desta espécie, assim como possíveis atividades biológicas do mesmo.

L. styraciflua tem potencial para ser utilizada como biomassa sustentável, pois pode ser utilizada em conversões bioquímicas e termoquímicas na geração de biocombustíveis. Além disso, evidências científicas e anedóticas sugerem que esta espécie também poderia servir como uma fonte de co-produtos fitoquímicos de alto valor (MARTIN *et al.*, 2010).

Segundo algumas pesquisas feitas nos Estados Unidos, esta será a nova super árvore, pois ela apresenta uma alta resistência a fungos, fibras com excelente qualidade, das suas cascas é extraída uma resina de grande valor, a madeira de lei é usada em móveis finos, além da sua elevada velocidade de crescimento (PLANTASONYA, 2011).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BOTÂNICO

4.1.1 Coleta e Identificação botânica

O material botânico foi coletado de exemplares de *Liquidambar styraciflua* L. cultivados e localizados no campo experimental da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA Florestas, que fica localizada no município de Colombo, região metropolitana de Curitiba, Estado do Paraná.

Foram coletadas as folhas, caules e cascas de *Liquidambar styraciflua*, durante o período de outono e primavera de 2011/2012.

Após a coleta do material botânico foi realizada uma exsicata que foi encaminhada ao herbário da Universidade Federal do Paraná (UFPR), para a identificação da espécie e receber o número de tombamento. No momento, é aguardada a confirmação do número de registro. O restante do material foi utilizado para extração (folhas, cascas e caules secos) e obtenção do óleo essencial (folhas secas).

4.1.2 Secagem do material botânico

As folhas da espécie em estudo foram separadas dos galhos manualmente, sendo então armazenadas à sombra e temperatura ambiente, durante um período de 15 dias para total secagem das mesmas.

As cascas foram retiradas por meio de material cortante e, juntamente com os caules, secas em estufa, com temperatura de 50°C, durante um período de 2 horas.

4.2 PREPARO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

4.2.1 Preparo do Extrato Hidroalcoólico a 20% (p/v)

O extrato hidroalcoólico das folhas de *L. styraciflua* foi preparado seguindo metodologia proposta por Moreira (1979) e Nakashima (1993). A técnica utilizada foi a maceração à temperatura moderada, para isso pesou-se 40 g do material botânico, devidamente triturados a pó grosso (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010), que, posteriormente, foram imersos em 200 mL de etanol a 70% (v/v) e levados ao banho-maria a 60 °C por um período de duas horas.

Após este tempo, o extrato foi filtrado em funil de vidro, com papel filtro, e teve seu volume completado para 200 mL, sendo acondicionado em frasco rotulado, devidamente fechado, sob refrigeração, até sua utilização.

O extrato hidroalcoólico das cascas e caule de *L. styraciflua* foi obtido seguindo os mesmos procedimentos descritos para o extrato hidroalcoólico das folhas. Este extrato também foi acondicionado em frasco rotulado, devidamente fechado, e armazenado sob refrigeração até a sua utilização.

4.2.2 Fracionamento do Extrato Hidroalcoólico

Após a obtenção do extrato hidroalcoólico das folhas, este foi colocado em balão de vidro apropriado para a concentração no rotaevaporador, com temperatura mantida em 60°C, até redução a 1/5 do volume total, ou seja, cerca de 40 mL.

Este volume foi utilizado para iniciar o fracionamento do extrato hidroalcoólico das folhas através da técnica de extração líquido/líquido em funil de separação, seguindo metodologia proposta por Nakashima (1993), com a utilização de solventes de polaridade crescente: n-hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol. Cada extração foi realizada com pequenos volumes do solvente extrator (10

x 20 mL), possibilitando assim um maior esgotamento do extrato, totalizando um volume final de 200 mL para cada fração.

Ao final de cada etapa do fracionamento, o volume do extrato restante foi levado ao banho-maria, na temperatura 60°C, para que houvesse completa evaporação do solvente extrator, e assim conduzir a próxima extração livre do solvente utilizado anteriormente, evitando formação de emulsão ou um fracionamento inadequado.

Após a completa evaporação do solvente extrator butanol, o extrato restante foi reconstituído com a adição de etanol 70% (v/v) até completar o volume de 200 mL, correspondendo à fração hidroalcoólica.

Cada fração foi então acondicionada em frascos rotulados e mantida sob refrigeração até sua utilização para os testes biológicos.

A extração líquido/líquido com solventes de polaridade crescente também foi realizada com o extrato hidroalcoólico das cascas e caule de *L. styraciflua*, tornando possível a obtenção das seguintes frações orgânicas deste órgão vegetal: fração hexano, fração clorofórmio, fração acetato de etila, fração butanol e fração hidroalcoólica. Todas as frações obtidas também foram armazenadas em frascos rotulados e mantidas sob refrigeração até a utilização das mesmas nos testes biológicos.

4.3 ÓLEO ESSENCIAL

4.3.1 Extração do óleo essencial

A extração do óleo essencial das folhas secas de *L. styraciflua* foi efetuada pelo método de hidrodestilação, utilizando-se o aparelho de Clevenger modificado por WASICKY apud FABROWSKI (2002), baseando-se na técnica preconizada pela FARMACOPÉIA Brasileira (2010).

Cem gramas de folhas fragmentadas foram pesadas e colocadas em um balão volumétrico, juntamente com pedaços de porcelana para regularizar a

ebulição. Então, foi acrescentada água destilada até 20 vezes o volume das folhas secas.

O balão foi acoplado ao aparelho de Clevenger e mantido sobre uma manta térmica a 95°C, aproximadamente. Assim que a primeira gota de óleo foi visualizada no tubo com escala graduada, foi marcado o tempo de aproximadamente 6 horas de extração. No término deste período, é recolhido o volume de óleo obtido em um frasco de vidro fechado, e armazenado no congelador para posteriores testes biológicos.

4.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4.4.1 Capacidade Antioxidante

A capacidade antioxidante do extrato hidroalcoólico e das frações das folhas, assim como, do extrato hidroalcoólico e frações das cascas e caule foi determinada por duas metodologias: o método do fosfomolibdênio e o método do 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH).

4.4.1.1 Método do Fosfomolibdênio

Esta metodologia, descrita por PRIETO, PINEDA e AGUILAR (1999), se baseia na redução do molibdênio VI a V pela amostra em análise, ocasionando a formação de um complexo verde entre fosfato e molibdênio (V), em pH ácido, que é então determinado espectrofotometricamente a 695 nm. Por meio desta técnica, é possível determinar a capacidade antioxidante total da amostra em estudo.

A solução reagente é preparada pela adição de 36 mL do reagente molibdato de amônio a 4 mmol/L, 28mL do reagente diidrogenofosfato de sódio 28 mmol/L, 20 mL do reagente ácido sulfúrico na concentração de 0,6 mol/L, sendo completado o volume para 100 mL com água destilada.

Neste ensaio, utilizamos o extrato hidroalcoólico das folhas e as frações acetato de etila, butanol e hidroalcoólica, o extrato hidroalcoólico das cascas e caule, bem como, as frações acetato de etila, fração butanólica e fração remanescente hidroalcoólica deste órgão vegetal. Estas frações foram escolhidas devido ao seu caráter de polaridade, possibilitando uma grande quantidade de compostos fenólicos nas mesmas, que podem apresentar características antioxidantes devido à sua estrutura química e propriedades redutoras. Como padrões-referência foram utilizados soluções metanólicas de rutina e ácido gálico, ambas submetidas ao ensaio nas concentrações de 25 µg/mL até 250 µg/mL, assim como as amostras.

Para o preparo do meio reacional uma alíquota de 100 µL da amostra foi depositada em um tubo de ensaio, juntamente com 1 mL da solução reagente. O tubo fechado hermeticamente é levado ao banho-maria a 95°C por 90 minutos. Decorrido este período, o tubo foi resfriado em temperatura ambiente e a leitura efetuada em espectrofotômetro UV/Vis SHIMADZU-1800 a 695 nm contra um branco (100 µL de metanol, acrescidos de 1 mL do reativo).

Uma curva analítica foi construída com os valores das absorbâncias a 695nm de uma solução de ácido ascórbico nas concentrações de 25 µg/mL a 250 µg/mL, que recebeu o mesmo tratamento das amostras. Uma equação da reta foi obtida, e esta utilizada para a determinação da capacidade antioxidante total das amostras e dos padrões-referência, expressa como µg de ácido ascórbico / g de extrato.

Estes resultados também podem ser expressos, de forma qualitativa, através do cálculo da Porcentagem de Atividade Antioxidante Relativa, segundo a equação 01:

$$\%AAR = (Abs_{amostra} - Abs_{branco} / Abs_{AA} - Abs_{branco}) \times 100 \quad (01)$$

Sendo:

$Abs_{amostra}$ absorbância da amostra ou padrão,

Abs_{branco} absorbância da solução metanólica,

Abs_{AA} absorbância da solução de ácido ascórbico.

Para efeitos de cálculo, o ácido ascórbico foi considerado como 100% de atividade antioxidante, e todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.4.1.2 Método do DPPH

O radical livre DPPH é um cromóforo muito estável, com absorção máxima no comprimento de onda de 517 nm, e apresenta, quando em solução, uma coloração violeta (BLOIS, 1958; ARNAO, 2000). Na medida em que o radical livre DPPH vai sendo reduzido por uma substância antioxidante, ocorre o emparelhamento de seu elétron, promovendo uma alteração do seu comprimento de onda de absorção (BRAND, WILLIAMS, COUVELIER, BERSSET, 1995), o que provoca uma mudança na coloração da solução, demonstrada pela Figura 9.



FIGURA 9 – SOLUÇÃO DE DPPH A 40 $\mu\text{g/mL}$, ANTES E DEPOIS DE RECEBER UM ELÉTRON DE UMA SUBSTÂNCIA ANTIOXIDANTE.
FONTE: O AUTOR (2011)

NOTA: Tubo da esquerda: solução inicial de DPPH, Tubo da direita: solução de DPPH reduzida pela substância antioxidante.

O método do DPPH proposto é baseado segundo Blois (1958), modificado por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), seguindo a metodologia descrita por Sousa e colaboradores (2007), com algumas modificações, analisando-se as mesmas amostras utilizadas na técnica do fosfomolibdênio.

Inicialmente, foi realizada uma curva analítica através dos valores da absorbância a 515 nm de uma solução de DPPH a 40 $\mu\text{g/mL}$ e respectivas diluições (até 1 $\mu\text{g/mL}$), leituras realizadas em espectrofotômetro UV/Vis SHIMADZU-1800, utilizando metanol como branco. Com estes valores tornou-se possível obter uma equação da reta, determinante dos demais resultados.

Todas as amostras foram submetidas a este teste nas concentrações de 25 a 250 $\mu\text{g/mL}$, assim como, os padrões-referência (solução de ácido ascórbico, rutina e ácido gálico). Para a elaboração do meio reacional, adicionou-se 0,3 mL da solução

amostra ou padrão-referência e 2,7 mL da solução de DPPH 40 µg/mL. Após o período de 30 minutos (tempo necessário para que ocorra a reação), foi efetuada a leitura das absorbâncias das misturas reacionais a 515 nm.

Com os valores das médias das absorbâncias (n=3), e a equação da reta da curva analítica, é possível deduzir a concentração de DPPH remanescente em cada amostra ou padrão-referência, para então determinar os percentuais de DPPH remanescente, através da seguinte equação 02:

$$\%DPPH_{REM} = [DPPH]_{T=t} / [DPPH]_{T=0} \times 100 \quad (02)$$

Aonde,

$[DPPH]_{T=t}$ corresponde à concentração de DPPH após a reação com a amostra ou padrão-referência

$[DPPH]_{T=0}$ é a concentração inicial de DPPH (40 µg/mL).

Para cada concentração das amostras e padrões-referência em estudo, também foi calculada a porcentagem de atividade antioxidante (%AA), conforme a equação 03 abaixo:

$$\%AA = \{ [Abs_{controle} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})] \times 100 \} / Abs_{controle} \quad (03)$$

Sendo:

$Abs_{controle}$ a absorbância inicial da solução metanólica de DPPH,

Abs_{branco} a absorbância da solução de metanol

$Abs_{amostra}$ a absorbância da solução reacional.

De posse destes valores, foi efetuado o cálculo da concentração eficiente (CE_{50}) de cada amostra e padrão-referência, ou seja, a quantidade de substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial da solução de DPPH. Este valor foi determinado através da construção de um gráfico, plotando-se na abscissa as concentrações da amostra ou padrão-referência (µg/mL) e na ordenada, a porcentagem de DPPH remanescente ($\%DPPH_{REM}$).

4.4.2 Atividade Antimicrobiana

4.4.2.1 Micro-organismos

Para os testes antibacterianos foram selecionadas oito cepas-padrão de bactérias, provenientes da empresa NEWPROV, sendo quatro Gram-positivas e quatro Gram-negativas. Dentre as Gram-positivas, utilizamos os micro-organismos *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Das Gram-negativas, as bactérias de estudo foram *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 e *Proteus mirabilis* ATCC 25933.

Nos testes antifúngicos, foram utilizadas cinco cepas-padrão de leveduras: *Candida glabrata*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* e *Trichosporon beigelli*. Estas cinco leveduras são provenientes do Laboratório de Micologia do Hospital de Clínicas (Curitiba-PR), e são frequentemente isoladas de pacientes.

4.4.2.2 Meio de cultura

Para a realização dos testes antimicrobianos foram utilizados os seguintes meios de cultura:

- Mueller-Hinton Agar e Mueller-Hinton caldo, para o crescimento das bactérias.

- Sabouraud Agar e Sabouraud caldo, para o crescimento das leveduras.

Todos os meios de cultura foram preparados conforme instruções do fabricante, e logo após levados para a autoclavagem durante 20 min a 121°C.

4.4.2.3 Preparo do inóculo

As bactérias e as leveduras foram inoculadas em placas de Petri pequenas (90 mmX15 mm) contendo meio de cultura de acordo com o micro-organismo. Para as bactérias foi utilizado Agar Mueller-Hinton, levando-se para a estufa a 35°C por 24 horas. Para as leveduras, Agar Sabouraud, e o crescimento em estufa a 28°C num período de 48 horas.

Após o crescimento nas placas, as bactérias e leveduras foram inoculadas em solução salina estéril (0,9%), ajustando a turbidez com a solução padrão de MacFarland n°0,5 para obtenção de uma concentração padrão de micro-organismos ($1 \cdot 10^8$ UFC/mL).

4.4.2.4 Difusão em meio sólido a partir de orifício

Para uma investigação preliminar da capacidade antimicrobiana do extrato das folhas e do extrato das cascas e caule, assim como, do óleo essencial, foi utilizada a técnica da difusão em meio sólido a partir de orifício (BAUER *et al.*, 1966; ALVES *et al.*, 2000; ANTUNES *et al.*, 2006; AYRES *et al.*, 2008) com algumas modificações, seguindo as recomendações do NCCLS/CLSI (2005).

O extrato das folhas e o extrato das cascas e caule foram analisados em seis concentrações, partindo de uma concentração inicial de 2000 µg/mL, obtendo as demais concentrações pelo processo de diluição seriada (1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL e 62,5 µg/mL) utilizando como solvente etanol a 70%.

O óleo essencial foi analisado em quatro concentrações diferentes pelo mesmo processo de diluição seriada (1:2, 1:4, 1:8, 1:16), utilizando Dimetil-Sulfóxido (DMSO) como solvente.

A semeadura dos inóculos, previamente padronizados na concentração de $1 \cdot 10^8$ UFC/mL é realizada com o auxílio de um swab estéril e de forma homogênea nos meios de cultura Agar Mueller-Hiton e Agar Sabouraud.

Com o auxílio de ponteiros descartáveis estéreis realizou-se a perfuração do meio sólido, obtendo cavidades com 8 milímetros de diâmetro. Nestas cavidades

foram adicionados 20 µL de cada amostra e dos controles negativos (solventes utilizados).

Paralelamente, em placas separadas, foram inoculados os padrões-referência. Para as leveduras, foram utilizadas soluções de Cetoconazol (50 µg/20 µL) e Terbinafina (50 µg/20 µL), seguindo metodologia anteriormente descrita.

Para as bactérias, discos de antibióticos padrões da empresa NEWPROV (Ampicilina 10 µg, Eritromicina 15 µg, Gentamicina 10 µg, Penicilina 10 µg, Tetraciclina 30 µg e Vancomicina 30 µg) foram utilizados como controles positivos, aplicando-se a metodologia da difusão em disco (BAUER *et al.*, 1966) para avaliar o potencial destes.

Após 30 min, as placas de Petri com as amostras são incubadas, sem inversão, em estufa a 35°C por 24 horas para as bactérias, enquanto que as leveduras são incubadas em estufa a 28°C por 48 horas. As placas contendo os discos de antibióticos padrões são incubadas invertidas, em estufa a 35°C por 24 horas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

A mensuração do halo de inibição do crescimento bacteriano é realizada com o auxílio de uma régua graduada em milímetros, segundo a USP XXVIII (2005).

4.4.2.5 Teste da Microdiluição em Caldo

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato hidroalcoólico das folhas, do extrato hidroalcoólico das cascas e caule e do óleo essencial frente às oito cepas padrão de bactérias foi realizada em uma microplaca esterilizada de 96 orifícios ou poços, conforme metodologias descritas (AYRES *et al.*, 2008; HANAMANTHAGOUDA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2011) com algumas modificações. As recomendações da NCCLS/CLSI (2005) foram novamente aplicadas.

Inicialmente, são depositados 100 µL de caldo Müller-Hinton em todos os poços envolvidos no teste. Na coluna 1 – linha A acrescentou-se 100 µL do extrato das cascas e caule na concentração de 2000 µg/mL. Em seguida, 100 µL do conteúdo do orifício foram homogeneizados com o meio e transferidos para o orifício da linha seguinte (B), repetindo-se este procedimento até a linha H, de modo a obter

uma concentração decrescente do extrato (2000 µg/mL a 15,625 µg/mL) por meio da diluição seriada com o próprio meio de cultura.

Posteriormente, é adicionado 10 µL do inóculo bacteriano, de crescimento recente (24 horas). Este inóculo foi preparado através da comparação da turvação à escala de MacFarland n° 0,5, após, diluído na proporção 1:10 com solução salina estéril (0,9 %), de modo a obter uma concentração final da suspensão bacteriana de 10^4 UFC/mL.

As placas são tampadas e incubadas a 35°C por 24 horas. Decorrido este período, é acrescentado 20 µL do indicador TTC (cloreto de trifenil tetrazolium) a 0,5 % (p/v), e a placa re-incubada por 1 hora na referida temperatura.

A CIM é definida como a menor concentração do extrato capaz de impedir o aparecimento de coloração vermelha, ou seja, inibir o crescimento bacteriano.

Este teste foi realizado em triplicata. Nas colunas 4, 5 e 6 adicionou-se o extrato das folhas, na mesma concentração inicial do extrato das cascas e caule, repetindo o mesmo procedimento. Nas colunas 7, 8 e 9 foi adicionado o óleo essencial, na diluição inicial de 1:2 com o solvente Tween 80 a 10 % (solução aquosa). É repetido o mesmo procedimento de diluição seriada com o óleo essencial, obtendo concentrações de 1:2 até 1:256, assim como, as demais etapas desta técnica.

Nas colunas 10, 11 e 12 foram adicionados os controles positivos (Eritromicina 30 µg/mL para as bactérias, Cetoconazol 50 µg/mL e Terbinafina 50 µg/mL para as leveduras), os controles negativos (etanol 70 % e Tween 80 a 10%) e o controle de esterilidade do meio de cultura.

A disposição das amostras e controles nas microplacas foi realizada conforme a figura número 10, apresentada abaixo:

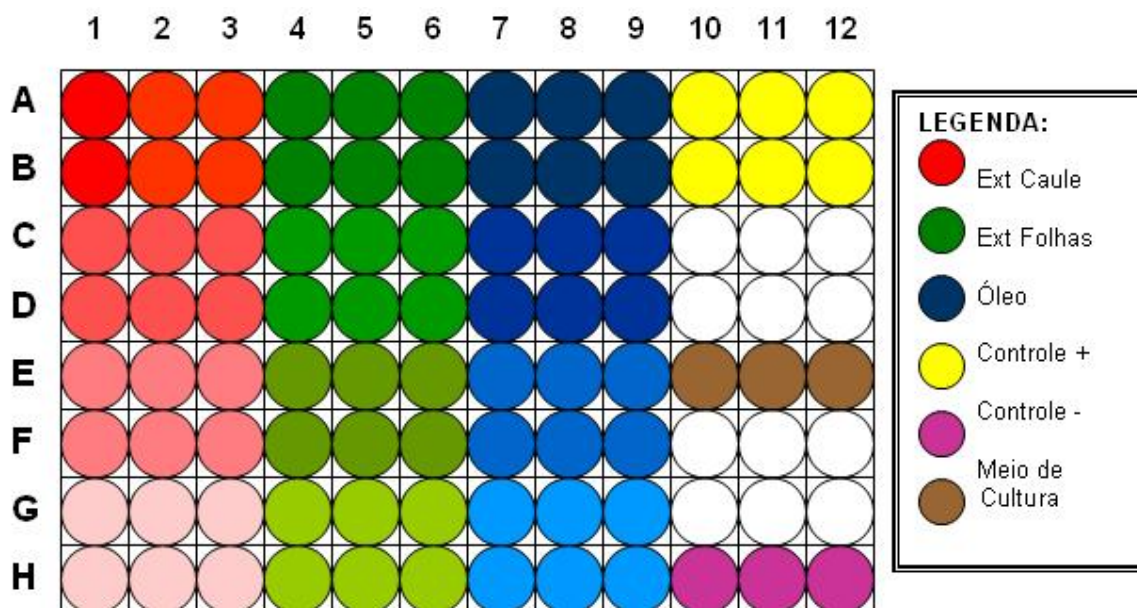


FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MICROPLACA UTILIZADA PARA A DETERMINAÇÃO DA CIM DAS AMOSTRAS.
FONTE: O AUTOR (2012)

O mesmo procedimento foi realizado para determinar a CIM destas amostras frente às cinco cepas padrão de leveduras, utilizando como meio de cultura o caldo Sabouraud, e incubando as microplacas em estufa a 28°C por 48hrs, requisitos necessários para o desenvolvimento destes micro-organismos.

As amostras que apresentaram valores de CIM menores que 10 µg/mL foram consideradas excelentes; valores entre 10 e 100 µg/mL como boa atividade e valores entre 100 e 500 µg/mL atividade moderada. Valores acima de 500 µg/mL foram considerados de fraca atividade (MACHADO *et al.*, 2005).

4.4.2.6 Concentração Bacteriostática / Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungistática / Fungicida Mínima (CFM)

A fim de verificar a capacidade da amostra em inibir o crescimento dos micro-organismos ou de provocar a morte dos mesmos, uma metodologia descrita por Veljic e colaboradores (2010), com algumas modificações, foi realizada.

Dos poços que apresentaram a CIM foi retirada uma alíquota de 10 µL, esta repicada em placas de petri contendo o meio de cultura Mueller-Hinton ou Sabouraud, de acordo com cada micro-organismo.

As placas foram incubas a 35°C por 24 horas (bactérias) ou a 28°C por 48 horas (leveduras). Após este período, aquelas amostras que não apresentaram crescimento microbiano visível, indicam a morte de 99,5% dos micro-organismos presentes no inóculo, portanto tem atividade bactericida/fungicida. As amostras que apresentaram crescimento microbiano visível possuem atividade bacteriostática/fungistática.

4.4.3 Atividade Hemolítica

4.4.3.1 Atividade Hemolítica em Placas de Agar Sangue

A atividade hemolítica das amostras em estudo foi determinada, inicialmente, através da metodologia de difusão em Agar, que foi descrita por Flach, Karnopp, Corção (2005), com adaptações.

Neste teste, verificamos a atividade hemolítica do extrato das folhas e suas frações, do extrato das cascas e caule e suas frações, e do óleo essencial das folhas.

Em placas de Agar Sangue, que são preparadas com meio Agar Sangue Base seguido da adição de 5% de sangue de carneiro desfibrinado estéril (adquirido da empresa NEWPROV), é realizada a distribuição dos discos de papel estéreis impregnados com 20 µL da amostra na concentração de 1000 µg/mL. Após, as placas são incubadas a 35°C durante 24 horas.

Para controle são utilizados 20 µL de solventes puros (solventes que foram utilizados no preparo de cada amostra) aplicados aos discos. Para o controle positivo utilizou-se uma solução de saponina, também na concentração de 1000 µg/mL, sendo aplicado o mesmo volume, 20 µL, sobre o disco de papel. E para o controle negativo foi utilizada uma solução salina na concentração de 0,9%. Todos os controles receberam o mesmo tratamento das amostras.

Após 24 horas, as placas são inspecionadas quanto à presença de halos de hemólise, estes medidos em milímetros.

4.4.3.2 Atividade Hemolítica em Tubos de Sangue de Carneiro

Esta metodologia é baseada na descrita pela Farmacopéia Brasileira (2010) para a determinação da atividade hemolítica de extratos vegetais, com algumas modificações.

Inicialmente, deve-se preparar uma solução de sangue a 2% com tampão fosfato pH 7,4. Para o preparo desta, se fez necessário a utilização de sangue de carneiro desfibrinado estéril, adquirido da empresa NEWPROV. Esta solução poderá ser utilizada enquanto o líquido sobrenadante permanecer límpido e incolor, sendo mantida a frio.

No teste preliminar, preparou-se uma diluição em série do extrato das folhas e das suas frações, do extrato das cascas e caule e das suas frações, e do óleo essencial, com o tampão fosfato pH 7,4 e a solução de sangue a 2%, conforme a Tabela 1.

TABELA 1 – DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS PARA O TESTE DE HEMÓLISE

<i>Tubo</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
Amostra vegetal (mL)	0,10	0,20	0,50	1,00
Tampão fosfato pH 7,4 (mL)	0,90	0,80	0,50	-
Suspensão de sangue (mL)	1,00	1,00	1,00	1,00

Como controle positivo é utilizado uma solução de saponina recém-preparada conforme descrito na metodologia, que recebeu o mesmo tratamento das amostras.

Após o preparo dos tubos, eles são invertidos cuidadosamente para misturar, tendo o cuidado de evitar a formação de espuma. Decorrido o tempo de 30 minutos, foi repetida a operação e deixado em repouso por mais 150 minutos para então levar a centrífuga por 5 minutos a 3000 rpm.

Os tubos são analisados quanto à ocorrência de hemólise total, ou seja, presença de líquido límpido vermelho, sem depósito de eritrócitos.

Caso ocorra hemólise total em algum dos tubos, a técnica preconiza uma segunda bateria de diluições, o teste principal. Como não houve hemólise total com nenhuma das amostras aqui testadas, não foi necessário realizar esta etapa da metodologia.

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises foram realizadas através do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011). Inicialmente, foi realizada a análise de variância (ANOVA), para detectar a existência de diferenças. Os fatores que expressaram significância foram submetidos ao teste de comparação de médias Tukey a 1% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS E FRAÇÕES ORGÂNICAS

A partir das folhas de *L. styraciflua*, foi obtido o extrato hidroalcoólico (20% p/v), que também foi utilizado para o preparo das frações orgânicas (hexano, clorofórmio, acetato de etila, butanol e hidroalcoólica remanescente). Tanto o extrato, quanto as frações, foram utilizados para os testes biológicos.

Com as cascas e caule desta espécie, também foi preparado um extrato hidroalcoólico (20% p/v), e, através da extração líquido/líquido, foi possível a obtenção da fração hexano, fração clorofórmio, fração acetato de etila, fração butanol e fração hidroalcoólica remanescente deste órgão vegetal. Estes materiais também foram utilizados nos testes biológicos.

5.1.2 Rendimentos das frações

Os rendimentos de cada fração das folhas e das cascas e caule são apresentados na Tabela 2.

A fração hexânica das folhas apresentou o menor rendimento, enquanto que a fração butanol foi a de melhor rendimento. Estes valores podem indicar uma maior concentração de compostos fenólicos neste órgão vegetal, uma vez que, devido as suas características de polaridade (presença das hidroxilas fenólicas), são extraídos, em maior concentração nos solventes de maior polaridade, como o acetato de etila, butanol e hidroalcoólico.

A fração hexânica das cascas e caule apresentou um rendimento maior do que o encontrado para as folhas, pressupondo que este órgão vegetal contém um número maior de compostos extraíveis com este solvente, ou seja, compostos mais lipofílicos. Entretanto, sua fração hidroalcoólica remanescente foi a que exibiu o maior rendimento, indicando uma presença notável de compostos mais polares neste órgão vegetal.

TABELA 2 – RENDIMENTO EM % DAS FRAÇÕES DAS FOLHAS E DAS CASCAS E CAULE DE *L. styraciflua*

FRAÇÃO	FOLHAS (%)	CASCAS E CAULE (%)
HEXANO	0,25	1,15
CLOROFÓRMIO	0,55	0,9
ACETATO DE ETILA	4,9	1,25
BUTANOL	7,65	2,25
HIDROALCOÓLICA	7,4	4,7
REMANESCENTE		

5.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial extraído das folhas secas de *L. styraciflua* apresentou uma coloração amarelo-esverdeada (Figura 11), e um odor aromático levemente adocicado.



FIGURA 11 – ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS DE *Liquidambar styraciflua*.
FONTE: O AUTOR (2011)

5.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

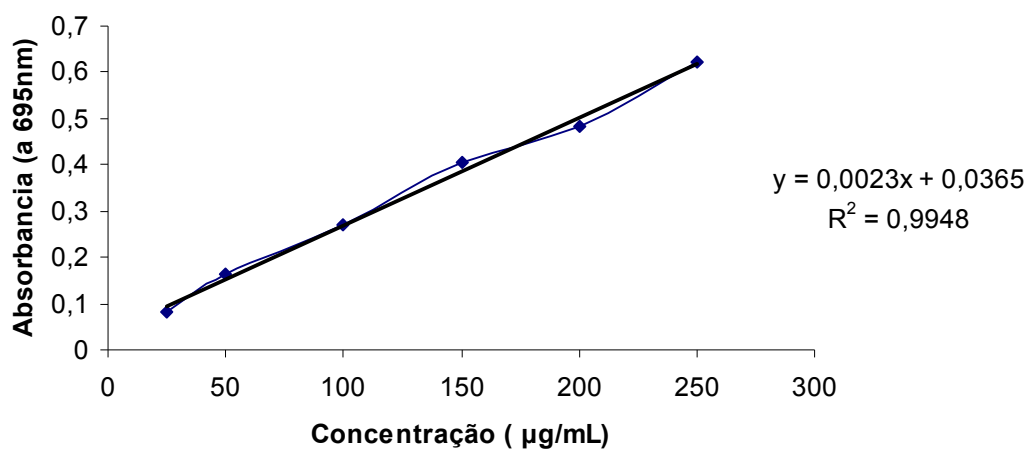
5.3.1 Capacidade Antioxidante

5.3.1.1 Método do Fosfomolibdênio

Para a determinação da capacidade antioxidante das frações acetato de etila, butanol e hidroalcoólica remanescente, assim como, dos extratos hidroalcoólicos das folhas e das cascas e caule pelo método do fosfomolibdênio, foi necessário a construção de uma curva analítica com uma solução de ácido ascórbico, apresentada no Gráfico 1. Nesta metodologia, a capacidade antioxidante da amostra pode ser visualizada através da mudança da coloração do meio reacional para uma solução esverdeada, demonstrado na Figura 12, que ocorre devido à redução do molibdênio VI a molibdênio V em pH ácido.

Na análise dos dados da solução de ácido ascórbico, foi obtida uma equação linear simples, onde $Y = 0,0023x + 0,0365$. Substituindo-se o Y pelo valor da média da absorbância, apresentada pela amostra, foi possível determinar a capacidade antioxidante total da mesma, expresso como μg de ácido ascórbico / g de material vegetal ($\mu\text{g AA/ g MV}$).

GRÁFICO 1 – CURVA ANALÍTICA DO ÁCIDO ASCÓRBICO



Os valores de capacidade antioxidante total das amostras e padrões-referência em cada concentração testada estão expostos na Tabela 3.



FIGURA 12 – FIGURA ILUSTRATIVA DE TUBOS CONTENDO SOLUÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO, APÓS CONDIÇÕES REACIONAIS DO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO.
FONTE: O AUTOR (2011)

NOTA: Da esquerda para a direita, concentrações da solução de ácido ascórbico de 150, 200 e 250 µg/mL.

TABELA 3 – CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL EM CADA CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS E DOS PADRÕES-REFERÊNCIA

AMOSTRA	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL ($\mu\text{g AA/g MV}$) \pm DP					
	25 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	150 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$	250 $\mu\text{g/mL}$
Extrato HA Folhas	17,03 \pm 0,0	50,07 \pm 0,0	93,41 \pm 0,05	159,35 \pm 0,01	192,83 \pm 0,01	256,74 \pm 0,01
Fração Acetato de Etila Folhas	35 \pm 0,01	72,83 \pm 0,02	148,19 \pm 0,01	225 \pm 0,05	254,86 \pm 0,03	322,1 \pm 0,01
Fração Butanol Folhas	11,96 \pm 0,0	27,32 \pm 0,01	61,23 \pm 0,02	104,56 \pm 0,01	147,03 \pm 0,01	181,96 \pm 0,01
Fração Hidroalcoólica Folhas	0,362 \pm 0,0	15,72 \pm 0,01	26,3 \pm 0,01	39,49 \pm 0,01	57,03 \pm 0,01	89,64 \pm 0,03
Extrato HA Cascas e Caule	36,01 \pm 0,02	61,96 \pm 0,01	151,96 \pm 0,07	170,07 \pm 0,03	242,83 \pm 0,03	283,12 \pm 0,03
Fração Acetato de Etila Cascas e Caule	155 \pm 0,01	285,43 \pm 0,07	402,83 \pm 0,05	550,22 \pm 0,02	609,78 \pm 0,02	700,65 \pm 0,03
Fração Butanol Cascas e Caule	55,43 \pm 0,01	111,52 \pm 0,03	223,7 \pm 0,02	348,9 \pm 0,04	436,3 \pm 0,05	514,6 \pm 0,02
Fração Hidroalcoólica Cascas e Caule	4,56 \pm 0,01	7,17 \pm 0,01	20,6 \pm 0,01	41,96 \pm 0,01	54,13 \pm 0,01	71,52 \pm 0,02
Rutina	31,81 \pm 0,02	46,3 \pm 0,02	85,43 \pm 0,02	124,28 \pm 0,01	138,91 \pm 0,01	187,61 \pm 0,03
Ácido Gálico	67,17 \pm 0,01	156,3 \pm 0,02	253,7 \pm 0,02	331,52 \pm 0,02	396,7 \pm 0,01	458,04 \pm 0,11

Avaliando os valores obtidos neste ensaio, é possível concluir que, tanto para as amostras, quanto para os padrões-referência, a capacidade antioxidante total é dose-dependente, pois conforme a concentração destas foi aumentada, os valores de capacidade antioxidante também o foram, sendo que a concentração máxima aqui testada, 250 $\mu\text{g/mL}$, corresponde ao maior valor de capacidade antioxidante total para todas as soluções analisadas. Por este motivo, utilizou-se somente os valores das capacidades antioxidantes totais encontradas para a concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ na realização das análises estatísticas.

De acordo com esta análise (Tabela 4), a fração acetato de etila das cascas e caule foi a amostra com a maior capacidade antioxidante total, sendo superior aos padrões-referência utilizados, ácido gálico e rutina. A rutina é um flavonóide da classe dos flavonóis, mesma classe da quercetina, que apresenta uma atividade antioxidante comprovada (FILHO, SILVA e BOVERIS, 2002), por sua vez, o ácido gálico, um ácido fenólico componente dos taninos hidrolisáveis das plantas, também tem ação antioxidante referenciada por diversos estudos (BARBOSA, 2010). Portanto, este resultado exibido pela fração acetato de etila das cascas e caule é de

extrema valia, já que se mostrou superior aos compostos referência em atividade antioxidante encontrados em plantas.

A fração butanol das cascas e caule apresentou capacidade antioxidante total semelhante ao padrão ácido gálico, enquanto que a fração butanol das folhas exibiu uma capacidade antioxidante total similar ao padrão rutina, porém inferior à encontrada para a mesma fração das cascas e caule.

TABELA 4 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL DAS AMOSTRAS E PADRÕES PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO

Tratamentos	Médias ($\mu\text{g AA/g MV}$)	Teste de Tukey
Fração Acetato de Etila Cascas e Caule	700.797100	a
Fração Butanol Cascas e Caule	514.710133	b
Ácido Gálico	458.043467	b
Fração Acetato de Etila Folhas	322.101433	c
Extrato Hidroalcoólico Cascas e Caule	283.115933	c
Extrato Hidroalcoólico Folhas	256.739100	c
Rutina	187.608700	d
Fração Butanol Folhas	181.956533	d
Fração Hidroalcoólica Folhas	89.637667	e
Fração Hidroalcoólica Cascas e Caule	71.521733	e

* Médias (n=3) seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,01$)

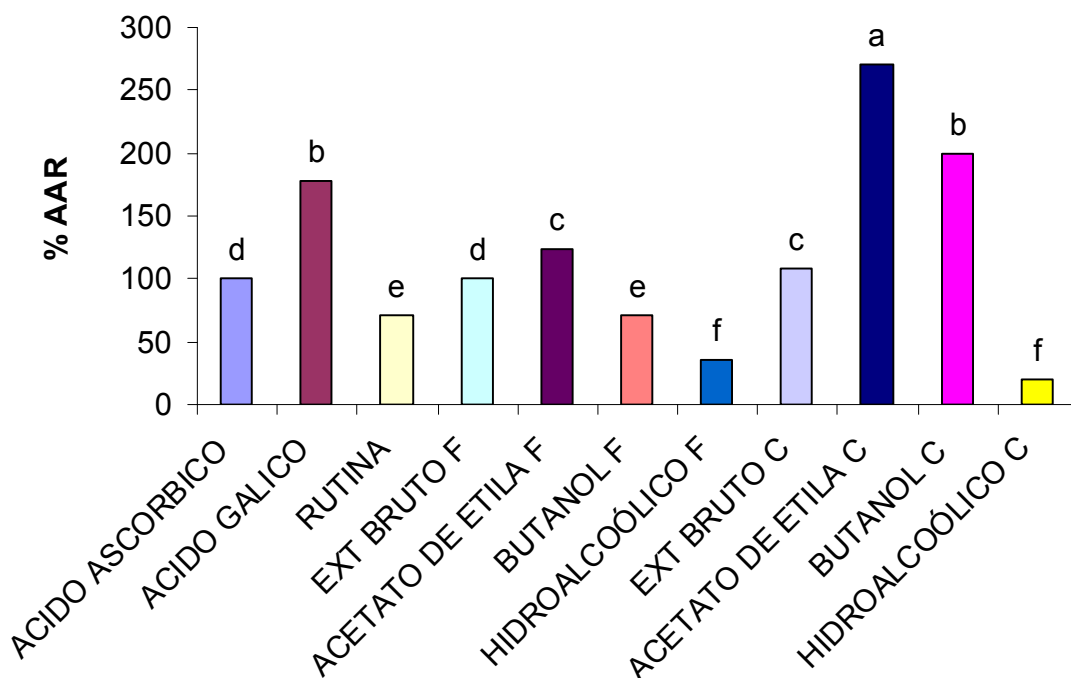
O extrato hidroalcoólico das folhas e o extrato hidroalcoólico das cascas e caule obtiveram resultados equivalentes estatisticamente, assim como, a fração acetato de etila das folhas, e, todos, foram superiores ao padrão-referência rutina, mas inferiores ao ácido gálico.

As frações hidroalcoólicas remanescentes, das folhas e das cascas e caule, apresentaram valores de capacidade antioxidante total, estatisticamente iguais e inferiores as demais amostras e padrões-referência aqui analisados.

Através de uma comparação com o ácido ascórbico, que, para efeitos de cálculo, é considerado como detentor de 100% de atividade antioxidante, foi estabelecido outro perfil de comparação, entre as amostras e padrões-referência, calculando os respectivos valores de porcentagem de atividade antioxidante relativa, expressos na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$, que estão representados no Gráfico 2.

Analisando estes resultados, verificamos que a fração acetato de etila das cascas e caule (270%) foi novamente superior a todas as amostras, padrões-referência, e, inclusive, ao ácido ascórbico, apresentando um valor quase três vezes maior que esta substância.

GRÁFICO 2 – PERCENTAGEM DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS AMOSTRAS E PADRÕES EM RELAÇÃO AO ÁCIDO ASCÓRBICO PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO



Nota: F: Folhas; C: Cascas e Caule

* Médias (n=3) seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,01$)

O padrão-referência ácido gálico (177,3%) também apresentou um valor superior ao ácido ascórbico, juntamente com a fração butanol das cascas e caule (199%), resultados estes que foram considerados estatisticamente semelhantes. Ambos os valores encontrados para o extrato hidroalcoólico (bruto) das cascas e caule (107,7%) e para a fração acetato de etila das folhas (124,3%), foram superiores ao ácido ascórbico e, igualitários entre si, mas inferiores aos referenciados acima.

O extrato hidroalcoólico (bruto) das folhas apresentou uma porcentagem de atividade antioxidante relativa (100%) idêntica ao ácido ascórbico (100%), enquanto que a fração butanol deste órgão vegetal foi inferior (70,7%), mas semelhante ao padrão-referência rutina (71,7%). Por fim, novamente, as frações hidroalcoólicas remanescentes apresentaram os menores valores (folhas 35,7%, cascas e caule 21%) e foram, estatisticamente, similares entre si, portanto ambas são detentoras de pouca atividade antioxidante.

Com esta metodologia, as frações e o extrato obtido das cascas e caule de *L.styraciflua* foram superiores as substâncias consideradas como referências em

atividade antioxidante, e também exibiram valores maiores do que os encontrados para as frações e extrato das folhas desta espécie. Esta constatação difere do que era esperado, uma vez que as folhas apresentam uma maior taxa de biossíntese de metabólitos bioativos e, conseqüentemente, uma maior concentração dos mesmos (ANTONIO, 2011).

Segundo Malinowski (2010), a metodologia do fosfomolibdênio permite detectar a capacidade antioxidante total de uma amostra, pois tanto substâncias que possuem a habilidade de doar um par de elétrons (mecanismo redox), que são os compostos com anéis fenólicos contendo duplas ligações, quanto substâncias que conseguem doar um elétron ou um hidrogênio (mecanismo radicalar), ou seja, compostos com hidroxilas disponíveis, podem provocar a redução do complexo do fosfomolibdênio. Portanto, o resultado obtido pelas amostras está relacionado a um ou a união destes dois mecanismos de redução.

O maior valor de capacidade antioxidante total encontrado para as amostras das cascas e caule de *L.styraciflua* pode então estar relacionado com a presença de compostos que agem por ambos os mecanismos de redução, radicalar e redox, provocando uma maior redução do complexo.

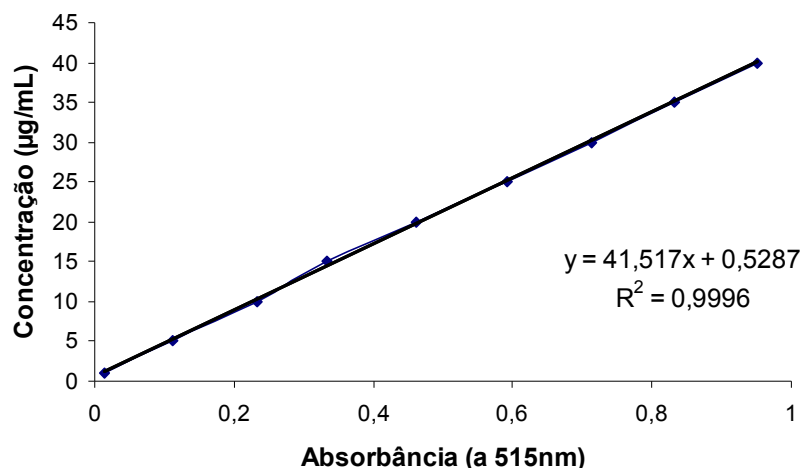
Em um estudo realizado por Wang e colaboradores (2010) com os extratos aquosos, etanólicos e acetônicos, preparados a partir das folhas de *Liquidambar formosana*, utilizando a metodologia do fosfomolibdênio, foram obtidos ótimos resultados de capacidade antioxidante total para todos os extratos analisados, sendo que todos exibiram um perfil dose-dependente. Os extratos aquosos e etanólicos apresentaram uma atividade similar e superior à apresentada pelo extrato acetônico, mas todos foram superiores ao padrão utilizado butil-hidroxi-tolueno (BHT).

5.3.1.2 Método do DPPH

A análise de regressão permitiu identificar uma resposta linear com a solução de DPPH (Gráfico 3), obtendo-se a seguinte equação: $y = 41,517x + 0,5287$. Através desta, foi possível determinar a porcentagem de DPPH remanescente em cada concentração das amostras e padrões-referência, sendo eles o ácido ascórbico, a rutina e o ácido gálico (Tabela 5). Com estes dados, a porcentagem de

atividade antioxidante das mesmas foi calculada, gerando resultados que podem ser observados nos Gráficos de 4 a 14.

GRÁFICO 3 – CURVA ANALÍTICA DO DPPH



Analisando as curvas analíticas obtidas com a fração butanol e hidroalcoólica das folhas (Gráficos 6 e 7), extrato hidroalcoólico (Gráfico 8), fração acetato de etila (Gráfico 9) e hidroalcoólica das cascas e caule (Gráfico 11), verifica-se um perfil de atividade antioxidante dose-dependente. Nas demais amostras ocorrem a formação de um platô, ou seja, a partir de uma determinada concentração não é mais perceptível a mudança na porcentagem de atividade antioxidante, representando assim o máximo de atividade antioxidante que aquela substância consegue alcançar por meio desta técnica de redução do radical livre DPPH. Dentro destas, podemos citar o extrato hidroalcoólico das folhas (Gráfico 4), que a partir da concentração de 200 µg/mL não apresentou mais alteração no valor de atividade antioxidante ($93,6 \pm 0,26\%$), enquanto que a fração acetato de etila deste mesmo órgão vegetal (Gráfico 5) manteve o mesmo valor de atividade antioxidante desde a concentração de 150 µg/mL ($94,6 \pm 0,16\%$). Nas amostras preparadas com as cascas e caule, verificamos a ocorrência de um platô somente com a fração butanol (Gráfico 10), a partir da concentração de 150 µg/mL ($104,95 \pm 0,06\%$).

TABELA 5 – PORCENTAGEM DE DPPH REMANESCENTE EM CADA CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS E PADRÕES-REFERÊNCIA

AMOSTRA	%DPPH REMANESCENTE \pm DP					
	25 μ g/mL	50 μ g/mL	100 μ g/mL	150 μ g/mL	200 μ g/mL	250 μ g/mL
Extrato HA Folhas	96,16 \pm 0,01	79,99 \pm 0,01	53,82 \pm 0,04	14,73 \pm 0,04	9,91 \pm 0,01	9,64 \pm 0,01
Fração Acetato de Etila Folhas	70,65 \pm 0,06	51,2 \pm 0,05	11,07 \pm 0,02	8,32 \pm 0,01	8,32 \pm 0,01	8,32 \pm 0,01
Fração Butanol Folhas	90,11 \pm 0,01	87,58 \pm 0,06	72,34 \pm 0,06	55,82 \pm 0,06	39,19 \pm 0,01	23,08 \pm 0,01
Fração Hidroalcoólica Folhas	94,67 \pm 0,02	92,83 \pm 0,01	91,25 \pm 0,06	83,2 \pm 0,03	79 \pm 0,04	64,9 \pm 0,04
Extrato HA Cascas e Caule	100 \pm 0,01	98,82 \pm 0,01	80,58 \pm 0,01	62,73 \pm 0,01	46,09 \pm 0,01	31,56 \pm 0,02
Fração Acetato de Etila Cascas e Caule	79,51 \pm 0,06	72,51 \pm 0,01	49,98 \pm 0,02	23,34 \pm 0,02	10,39 \pm 0,01	9,50 \pm 0,01
Fração Butanol Cascas e Caule	82,83 \pm 0,01	51,49 \pm 0,01	9,69 \pm 0,03	7,48 \pm 0,01	7,65 \pm 0,01	7,65 \pm 0,01
Fração Hidroalcoólica Cascas e Caule	53,77 \pm 0,01	53,32 \pm 0,01	52,25 \pm 0,01	50,83 \pm 0,01	49,72 \pm 0,01	48,10 \pm 0,01
Rutina	67,68 \pm 0,01	45,81 \pm 0,04	10,72 \pm 0,02	8,27 \pm 0,01	8,27 \pm 0,01	8,27 \pm 0,01
Ácido Gálico	24,17 \pm 0,01	8,08 \pm 0,01	8,08 \pm 0,01	7,76 \pm 0,01	7,66 \pm 0,01	7,66 \pm 0,01
Ácido Ascórbico	63,45 \pm 0,02	31,45 \pm 0,02	5,68 \pm 0,01	5,38 \pm 0,01	4,75 \pm 0,01	4,65 \pm 0,01

Os padrões-referência utilizados também apresentaram um platô, no caso do ácido ascórbico (Gráfico 12), com a concentração de 100 μ g/mL, já foi evidenciada sua máxima atividade antioxidante (96,6 \pm 0,06%), não ocorrendo mais alterações neste valor com o aumento da sua concentração. Por sua vez, a rutina (Gráfico 13) exibiu este mesmo comportamento a partir da concentração de 150 μ g/mL (93,26 \pm 0,05%). Entre todos, o ácido gálico (Gráfico 14) foi a substância que atingiu este platô na menor concentração, 50 μ g/mL, já alcançando a sua potente atividade antioxidante (93,6 \pm 0,11%).

GRÁFICO 4 – CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS, PELO MÉTODO DO DPPH

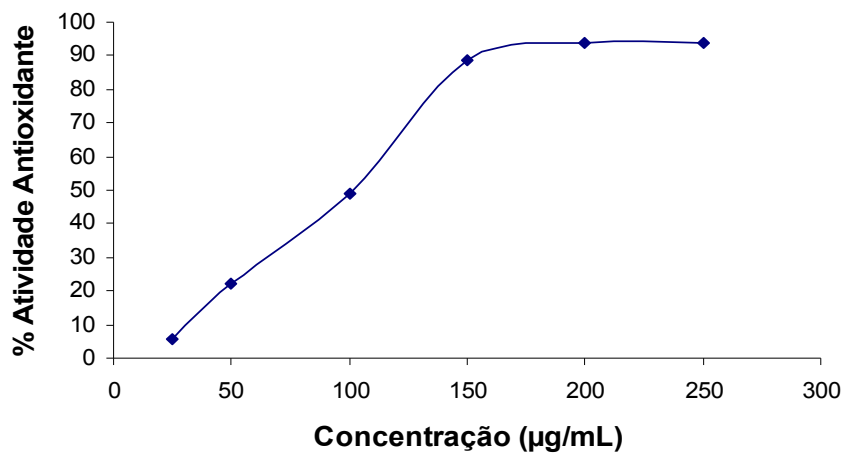


GRÁFICO 5 – CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS, PELO MÉTODO DO DPPH

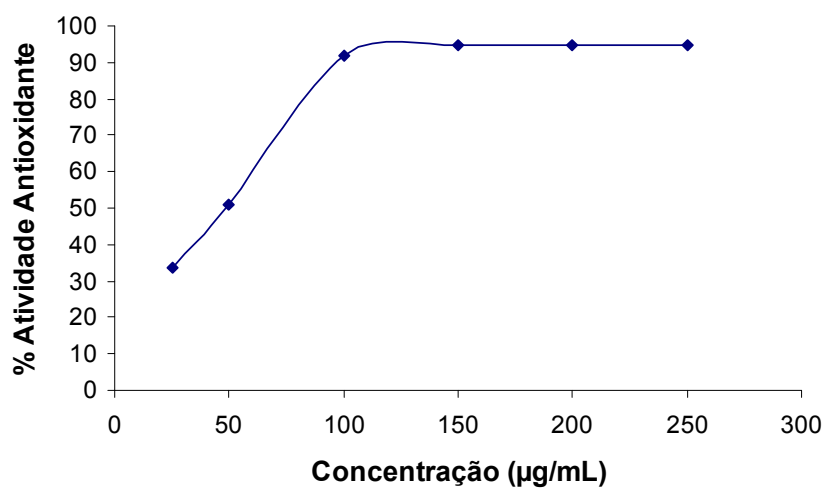


GRÁFICO 6 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO BUTANOL DAS FOLHAS, PELO MÉTODO DO DPPH

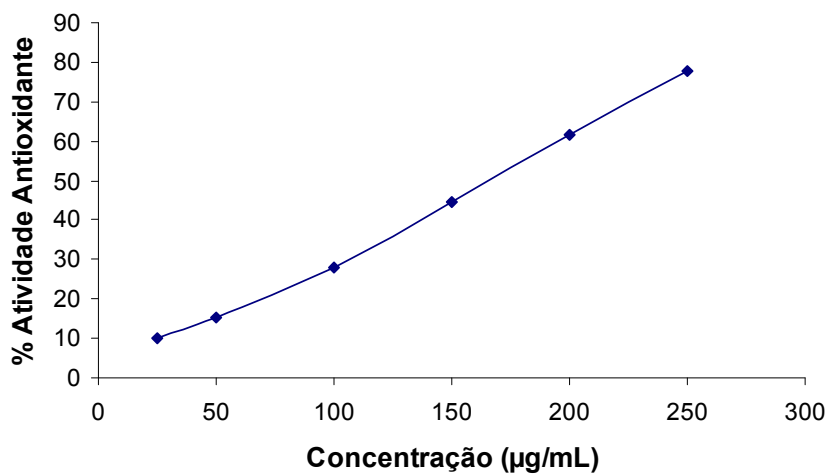


GRÁFICO 7 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA DAS FOLHAS, PELO MÉTODO DO DPPH

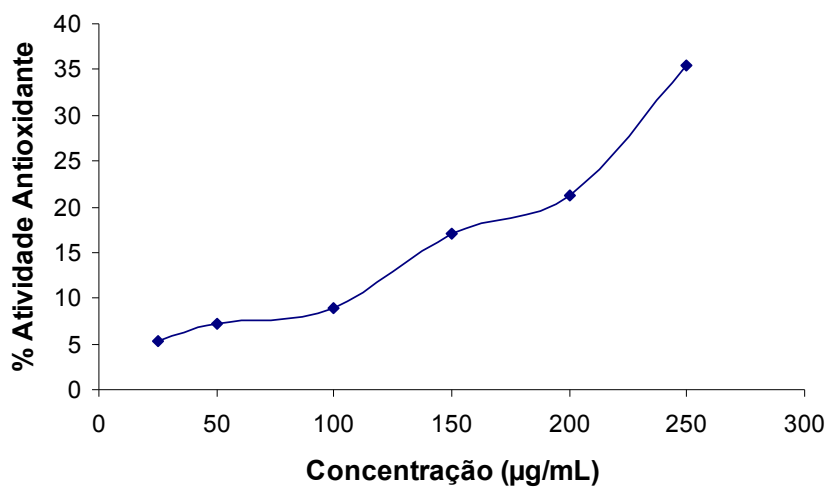


GRÁFICO 8 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS CASCAS E CAULE, PELO MÉTODO DO DPPH

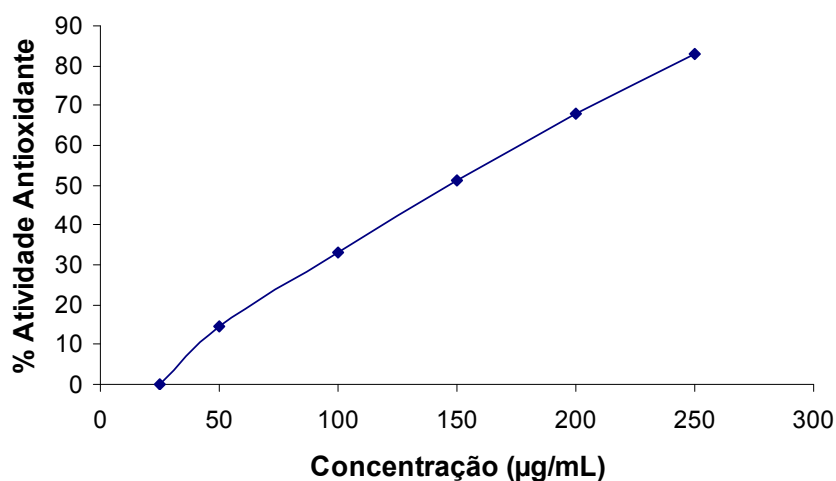


GRÁFICO 9 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS CASCAS E CAULE, PELO MÉTODO DO DPPH

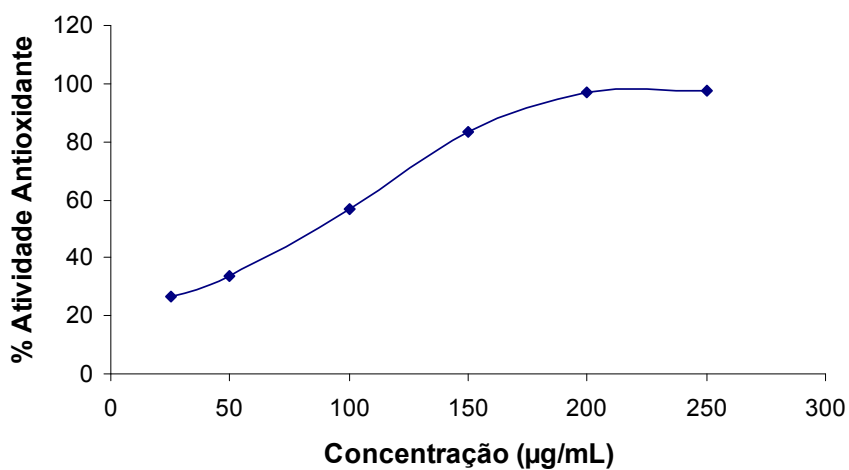


GRÁFICO 10 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO BUTANOL DAS CASCAS E CAULE, PELO MÉTODO DO DPPH

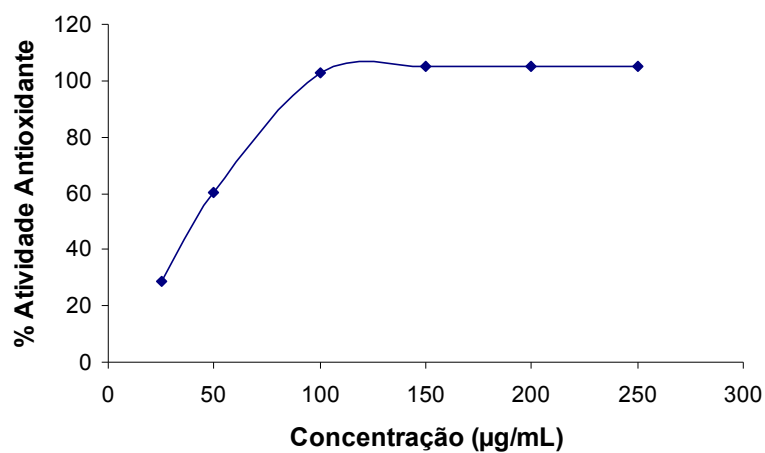


GRÁFICO 11 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA DAS CASCAS E CAULE, PELO MÉTODO DO DPPH

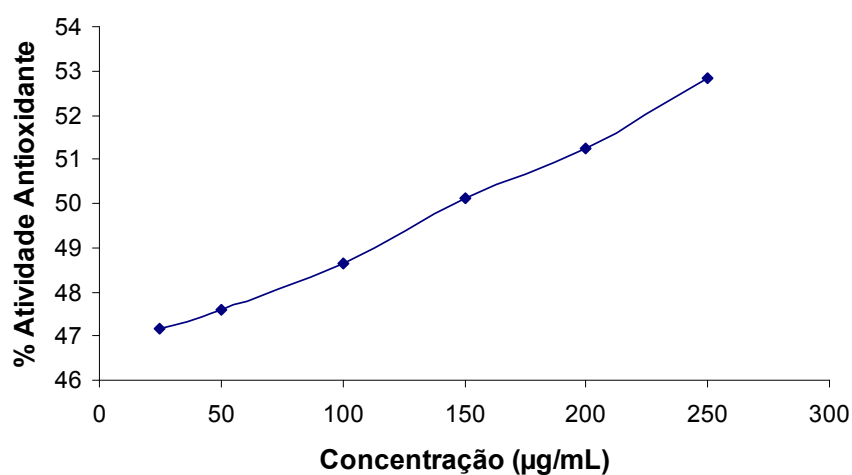


GRÁFICO 12 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA SOLUÇÃO METANÓLICA DE ÁCIDO ASCÓRBICO, PELO MÉTODO DO DPPH

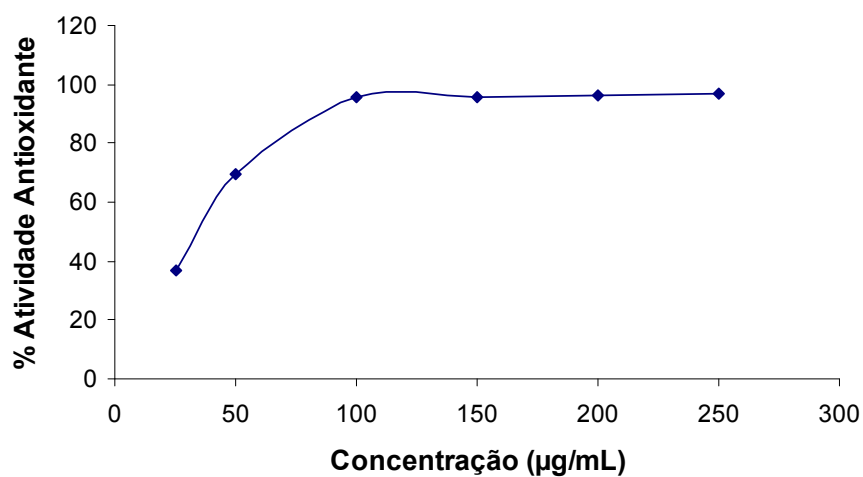


GRÁFICO 13 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA SOLUÇÃO METANÓLICA DE RUTINA, PELO MÉTODO DO DPPH

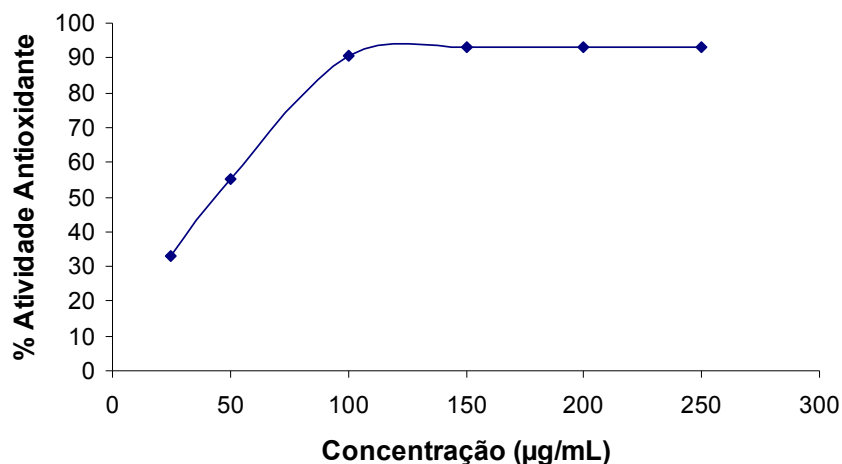
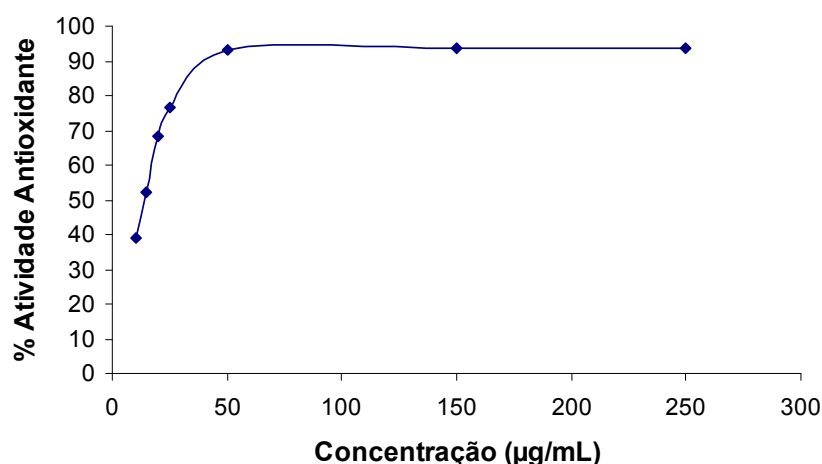


GRÁFICO 14 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA SOLUÇÃO METANÓLICA DE ÁCIDO GÁLICO, PELO MÉTODO DO DPPH



Os valores das atividades antioxidantes das amostras e padrões-referência na concentração de 250 µg/mL foram analisados pelo teste de Tukey, onde foram feitas comparações múltiplas. Este procedimento permitiu distinguir as amostras que possuem a mesma capacidade antioxidante daquelas que são diferentes, assim como, determinar qual apresenta a maior capacidade antioxidante por esta metodologia. Através dos resultados expostos na Tabela 6, pode-se verificar que houve diferença significativa entre as amostras ($p < 0,01$) e os padrões-referência, bem como, entre as próprias amostras testadas neste ensaio.

A fração butanol das cascas e caule apresentou o maior valor de porcentagem de atividade antioxidante, superior aos próprios padrões-referência que foram utilizados nesta metodologia. O valor exibido pela fração acetato de etila,

deste mesmo órgão vegetal, foi a segunda maior resposta de efeito antioxidante, entretanto, a média não diferiu do padrão ácido ascórbico e da fração acetato de etila das folhas. É possível visualizar a ação antioxidante desta fração (Figura 13), pois na concentração de 50 µg/mL já estava perceptível a mudança de coloração da solução-teste, que passou do roxo (coloração da solução de DPPH radical livre) ao amarelo (coloração da solução de DPPH reduzida).

TABELA 6 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA PORCENTAGEM DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS AMOSTRAS E CONTROLES POSITIVOS PELO MÉTODO DO DPPH

Tratamentos	Médias	Teste de Tukey
Fração Butanol Cascas e Caule	104.385960	a
Fração Acetato de Etila Cascas e Caule	97.699797	b
Ácido Ascórbico	96.596493	b, c
Fração Acetato de Etila Folhas	94.575303	b, c
Extrato Hidroalcoólico Folhas	93.955093	c
Ácido Gálico	93.543857	c
Rutina	93.262750	c
Extrato Hidroalcoólico Cascas e Caule	82.807013	d
Fração Butanol Folhas	77.758113	e
Fração Hidroalcoólica Cascas e Caule	52.877187	f
Fração Hidroalcoólica Folhas	36.312687	g

* Médias (n=3) seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,01)

A atividade antioxidante encontrada para o extrato bruto das folhas foi estatisticamente similar à exibida pelos padrões ácido gálico e rutina.

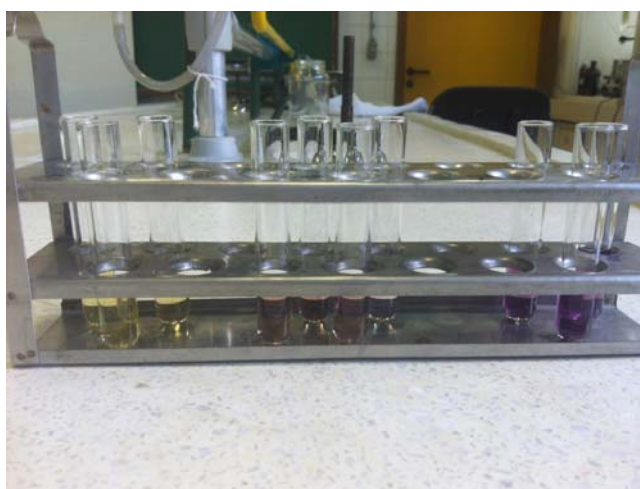


FIGURA 13 – TUBOS CONTENDO SOLUÇÃO DE DPPH E FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS CASCAS E CAULE, APÓS O TEMPO REACIONAL.

FONTE: O AUTOR (2012)

NOTA: Da direita para a esquerda, concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL da fração acetato de etila das cascas e caule testadas neste ensaio, após adição da solução de DPPH.

Já, o extrato hidroalcoólico das cascas e caule, apresentou uma porcentagem de atividade antioxidante significativamente inferior aos padrões-referência, mas superior a fração butanol das folhas, a fração hidroalcoólica das cascas e caule e a fração hidroalcoólica das folhas.

Estes resultados exibidos pelas amostras de *L.styraciflua* são relevantes, pois alguns foram similares e, até mesmo, superiores aos padrões de atividade antioxidantes já reconhecidos pela literatura. Novamente, encontram-se resultados melhores para as amostras das cascas e caule, do que para as folhas. Este dado pode estar indicando uma presença acentuada de compostos poli-hidroxi-aromáticos, neste órgão da espécie em estudo, uma vez que estes compostos apresentam uma capacidade maior de transferir elétrons para o DPPH do que substâncias aromáticas com somente uma hidroxila, devido à capacidade redox reduzida deste radical (BOSCARDIN, 2009). Outro fator que deve ser levado em consideração é que, este método, avalia somente o poder redutor do antioxidante, portanto, não é capaz de detectar substâncias pró-oxidantes (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006).

De posse dos valores de DPPH remanescente em cada concentração das amostras e padrões-referência, foi possível a construção de gráficos que forneceram como resposta uma equação linear de primeiro grau. Substituindo o y por 50 em cada uma destas equações, foi possível determinar o valor da concentração eficiente (CE_{50}) de cada uma das amostras e padrões, ou seja, o valor necessário para reduzir a concentração de DPPH em 50% (Tabela 7).

As substâncias utilizadas como padrões-referência foram as que exibiram os menores valores de concentração eficiente, sendo o ácido gálico o detentor da concentração mais baixa, seguido pelo ácido ascórbico e pela rutina.

Duas das amostras aqui analisadas apresentaram valores de CE_{50} próximos aos encontrados para os padrões, a fração acetato de etila das folhas, com um valor muito similar ao do padrão-referência rutina, e a fração butanol das cascas e caule. Não obstante, ambas também exibiram valores de porcentagem de atividade antioxidante elevados.

Entretanto, a fração acetato de etila das cascas e caule, que teve uma porcentagem de atividade antioxidante na concentração de 250 µg/mL equivalente a encontrada para o ácido ascórbico, necessita de uma concentração cerca de três

vezes maior do que este padrão-referência para conseguir reduzir a concentração inicial do DPPH em 50%.

TABELA 7 – VALORES DAS CE_{50} DAS AMOSTRAS E PADRÕES-REFERÊNCIA PELO ENSAIO DO DPPH

AMOSTRA / CONTROLE POSITIVO	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Extrato Hidroalcoólico Folhas	111,87
Fração Acetato de Etila Folhas	49,97
Fração Butanol Folhas	165,19
Fração Hidroalcoólica Folhas	406,9
Extrato Hidroalcoólico Cascas e Caule	191,3
Fração Acetato de Etila Cascas e Caule	98,17
Fração Butanol Cascas e Caule	56,24
Fração Hidroalcoólica Cascas e Caule	182,15
Ácido Ascórbico	35,88
Rutina	46,89
Ácido Gálico	14,27

O extrato hidroalcoólico das folhas exibiu um valor de CE_{50} próximo ao encontrado para a fração acetato de etila das cascas e caule, bem como, a fração butanol das folhas, a fração hidroalcoólica e o extrato hidroalcoólico das cascas e caule também apresentaram valores de concentração eficiente próximos, mas todos estes valores estão bem acima dos que foram encontrados para os padrões. A fração hidroalcoólica das folhas exibiu um valor extremamente elevado de CE_{50} , fato que coincide com o seu perfil de fraca atividade antioxidante que foi apresentado nos resultados anteriores.

Nas frações butanol e acetato de etila de ambos os órgãos analisados de *L.styraciflua* foram encontrados os melhores resultados para percentual de atividade antioxidante e concentração eficiente. O caráter de polaridade destas permite uma maior extração de compostos do tipo polifenóis, que possuem um perfil multifuncional na planta, pois podem agir como agentes redutores, doadores de hidrogênio e supressores de oxigênio singlete (KOROCH, JULIANI e ZYGADLO, 2007).

Portanto, a ação antioxidante destes compostos pode ocorrer através de vários mecanismos, como o bloqueio, a interferência ou supressão das atividades das enzimas envolvidas na geração das espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (ERO, ERN), atuando como quelantes de metais em transição, tornando-os inativos, ou ainda, neutralizando os radicais livres, ou seja, deixando-os estáveis (MOSQUERA, CORRERA e NIÑO, 2009). Estas características deste grupo de

metabólitos secundários que podem ser encontrados em uma planta (especialmente nas frações acetato de etila e butanol de um órgão vegetal) pode justificar a elevada capacidade antioxidante apresentada pela espécie em estudo.

Wang e colaboradores (2010) encontraram os seguintes valores de CE_{50} para as amostras preparadas a partir das folhas de *L. formosana*, no ensaio com DPPH: Extrato etanólico ($6,89 \pm 0,34 \mu\text{g/mL}$), extrato aquoso ($8,86 \pm 0,21 \mu\text{g/mL}$) e extrato acetônico ($12 \pm 0,23 \mu\text{g/mL}$). Todos os extratos tiveram valores de concentração eficiente menor do que o encontrado para o padrão BHT ($14,5 \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$) utilizado neste experimento. Dentre os extratos avaliados, o extrato etanólico exibiu o melhor perfil de atividade antioxidante em todos os ensaios que foram realizados.

Diferenças foram encontradas nos resultados apresentados pelas amostras de *L. styraciflua* e padrões-referência nas duas metodologias utilizadas. Isto prova que realmente existem mecanismos diversos e complexos, tanto para a inibição da oxidação quanto para a neutralização dos radicais livres, por isto, os resultados de cada método não devem ser comparados entre si se o princípio da reação não for mesmo (MALINOWSKI, 2010).

As ERO's podem ser o principal fator envolvido em muitas doenças degenerativas, por este motivo, os antioxidantes podem apresentar efeitos preventivos e terapêuticos nestas enfermidades (KOROCH, JULIANI e ZYGADLO, 2007). Em razão do grande interesse no uso de produtos naturais, também como antioxidantes na preservação de alimentos, estes resultados passam a ter significativa importância na determinação de efeitos benéficos para diferentes áreas. Sendo assim, o desenvolvimento comercial de plantas como novas fontes de antioxidantes para melhorar a saúde, podendo atuar na redução do desenvolvimento de doenças como a arteriosclerose, o diabetes, a hipertensão, doenças coronarianas e neurológicas degenerativas, redução da mutagenicidade e câncer, além de agir como conservante de alimentos torna esta área de pesquisa muito valiosa nos dias de hoje (BARBOSA, 2010).

5.3.2 Atividade Antimicrobiana

5.3.2.1 Difusão em meio sólido a partir de orifício

O ensaio de difusão em meio sólido a partir de orifício foi utilizado como triagem inicial da avaliação do potencial antibacteriano dos extratos pesquisados, frente às oito cepas padrões de bactérias, dentro destas, quatro bactérias Gram-positivas e quatro bactérias Gram-negativas. Este ensaio é empregado por vários autores como metodologia mais apropriada que o teste de difusão do extrato a partir de disco (AYRES *et al.*, 2008), pois se baseia na difusão radial das substâncias, e a possível presença de partículas em suspensão na amostra a ser testada não interfere na difusão da substância antimicrobiana no Agar, tornando este método apropriado para testar a difusão de substâncias em extratos etanólicos de plantas (SILVEIRA *et al.*, 2009).

Os extratos hidroalcoólicos não exibiram halo de inibição frente aos micro-organismos utilizados nesta metodologia, em nenhuma das suas seis concentrações. Já, o óleo essencial, apresentou resultados interessantes, que podem ser visualizados na Tabela 8.

Na sua menor diluição (1:2), o óleo essencial apresentou capacidade antimicrobiana para todas as cepas testadas, exceto para *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus pyogenes*. Os padrões Ampicilina e Penicilina (Tabela 9) também não foram capazes de inibir o crescimento destas bactérias, o que evidencia o fato destas serem cepas resistentes, pois a Penicilina é o antibiótico de primeira escolha em infecções causadas pelos Estreptococos do grupo A de Lancefield (SGA), como é o caso da *S. pyogenes*, principal representante desta classe (ANTIMICROBE, 2012).

Uma análise de variância foi realizada com os valores de halo de inibição apresentados pelo óleo essencial nesta maior concentração, onde foi verificada uma diferença significativa entre os resultados. Através das médias submetidas ao teste de Tukey, a espécie *Staphylococcus aureus* foi a mais sensível a ação antimicrobiana do óleo essencial, o que pode ser confirmado também pela presença

de halo de inibição mesmo na maior diluição do óleo essencial (1:16), fato ocorrido somente com esta cepa bacteriana.

TABELA 8 – VALORES DO HALO DE INIBIÇÃO APRESENTADOS PELAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÓLEO ESSENCIAL E PELO CONTROLE NEGATIVO *

Micro-organismos	Amostras (ZI mm)**					
	GRAM	Óleo 1:2	Óleo 1:4	Óleo 1:8	Óleo 1:16	DMSO
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	13	12	-	-	-
ATCC 14028		a, b	a			
<i>Escherichia coli</i>	-	12,3	-	-	-	-
ATCC 25922		b				
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	15	13	-	-	-
ATCC 13048		a, b	a			
<i>Proteus mirabilis</i>	-	12,5	-	-	-	-
ATCC 25933		b				
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	16,3	12,5	13,5	12	-
ATCC 25923		a	a			
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-	-	-	-	-
ATCC 29212						
<i>Streptococcus pyogenes</i>	+	-	-	-	-	-
ATCC 19615						
<i>Bacillus subtilis</i>	+	14,3	12	11,7	-	-
ATCC 6633		a, b	a			

*Médias (n=3) seguidas de letras iguais, na mesma coluna (amostra), não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,01$)

** Valores das zonas de inibição expressos em mm, incluindo o diâmetro da cavidade de 8mm; -: sem inibição

Os resultados obtidos para *Bacillus subtilis* (Figura 14), *Enterobacter aerogenes* e *Salmonella typhimurium* foram estatisticamente semelhantes a *S. aureus*.

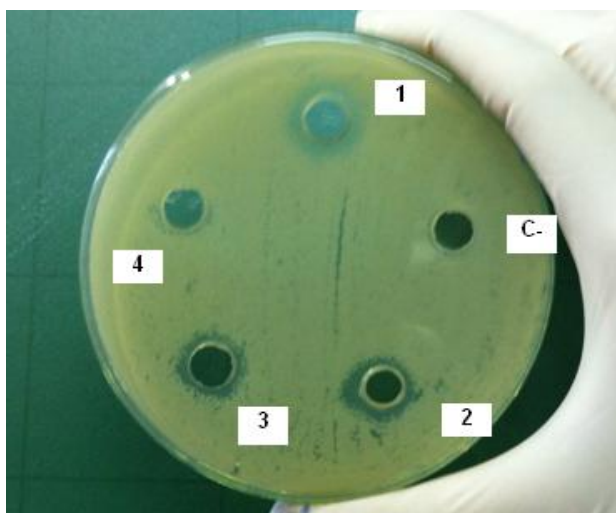


FIGURA 14 – PLACA ILUSTRANDO OS HALOS DE INIBIÇÃO OBTIDOS PELO ÓLEO ESSENCIAL FRENTE À BACTÉRIA *B. subtilis*, POR MEIO DO MÉTODO DE DIFUSÃO EM MEIO SÓLIDO A PARTIR DE ORIFÍCIO.

FONTE: O AUTOR (2012)

NOTA: 1 = óleo essencial (1:2); 2 = óleo essencial (1:4); 3 = óleo essencial (1:8); 4 = óleo essencial (1:16); C- = controle negativo (DMSO)

Por outro lado, estas últimas espécies exibiram médias que comprovaram semelhança também aos resultados obtidos com *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis*, que foram os valores mais baixos, sendo caracterizados como os de menor sensibilidade ao óleo essencial.

O óleo essencial, na diluição (1:4), foi capaz de promover halos de inibição no crescimento de *S. typhimurium*, *E. aerogenes*, *S. aureus* e *B. subtilis*, e, estes resultados, foram significativamente semelhantes.

Analisando os resultados obtidos pelos discos de antibióticos padrões, somente a Eritromicina, a Gentamicina e a Tetraciclina foram capazes de inibir o crescimento de todos os micro-organismos utilizados neste ensaio (Tabela 9). Isto comprova a multiplicidade de mecanismos de ação que as diferentes classes de antibióticos apresentam, conseguindo assim inibir o crescimento de bactérias tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas. A resistência desenvolvida pelas bactérias frente aos agentes antimicrobianos, devido a uma dinâmica habilidade destes em sofrer mutações e repassar aos seus descendentes, além de uma terapia antimicrobiana não seguida pelo seu prescritor ou pelo próprio paciente, dificultando a eficácia da mesma, aumenta a pressão seletiva desenvolvida por estes micro-organismos diante dos antibióticos (LIMA, 2002; FERREIRA *et al.*, 2010).

TABELA 9 – VALORES DOS HALOS DE INIBIÇÃO APRESENTADOS PELOS DISCOS DE ANTIBIÓTICOS PADRÕES

Micro-organismos	(ZI mm)*						
	G R A M	AMP 10 µg	ERI 15 µg	GEN 10 µg	PEN 10 µg	TET 30 µg	VAN 30 µg
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	-	20	14,3±0,6	17,3±2,5	13,3±1,5	19,7±0,6	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	15,3±0,6	19±1	17±3	9±1	24±1	8,7±1,5
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	-	-	12,3±2,1	15,3±0,6	-	20	-
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	-	21,7±1,5	7,3±6,4	18±2	19±1	10,3±0,6	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	+	42,3±2,1	33,3±2,9	22,3±0,6	37,7±2,5	32±1	18,7±0,6
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	+	-	16,3±2,1	19,7±1,1	-	24,3±1,1	7,3±6,4
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	+	-	12	20	-	20	-
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	+	25,5±3,5	29±8,2	26±3,6	24	27,7±6,8	19,7±2,5

* Valores (n=3) das zonas de inibição expressos em mm, incluindo o diâmetro do disco de 6mm; -: sem inibição

Como os discos de antibióticos testados possuíam 6 mm de diâmetro e as cavidades impregnados com o óleo essencial 8 mm, a forma determinada para comparação dos resultados foi mensurar a região de inibição entre a borda da cavidade/disco e o início do crescimento da bactéria. Assim foram desconsiderados os diferentes tamanhos dos discos e orifícios, permitindo uma análise estatística com estes valores. Também foram desconsiderados os resultados obtidos com as cepas *E. faecalis* e *S. pyogenes*, pois somente os antibióticos exibiram halos de inibição para ambas.

Utilizando estes dados (Tabela 10), é possível verificar que a ação do óleo essencial, em todas as suas diluições, não superou a ação dos antibióticos padrões, mas, verificam-se semelhanças entre alguns, o que corresponde a um resultado expressivo, uma vez que realizou-se uma comparação com os antibióticos que são mais utilizados na clínica para o tratamento de infecções bacterianas.

O óleo essencial (1:2) revelou uma ação similar a sua outra diluição (1:4) e a Penicilina na inibição do crescimento de *S. typhimurium*, entretanto, merece destaque, pois também foi significativamente semelhante a outro padrão, a Eritromicina. Quando analisado os resultados frente a *E. coli* verifica-se que o óleo (1:2) promoveu uma inibição semelhante à de três antibióticos: a Ampicilina, a Penicilina e a Vancomicina.

No tocante a bactéria *E. aerogenes*, há um resultado significativamente equivalente para o óleo essencial, nas suas duas diluições (1:2 e 1:4), e os padrões Eritromicina e Gentamicina. Já, a ação do óleo essencial na inibição do crescimento de *P. mirabilis*, ocorreu somente na sua menor diluição (1:2), mas com inibição similar aos antibióticos Eritromicina e Tetraciclina.

Em relação às duas bactérias Gram-positivas, *S. aureus* e *B. subtilis*, existe uma maior capacidade de inibição do óleo essencial, pois este apresentou regiões de inibição mesmo em suas maiores diluições. A maior sensibilidade de *S. aureus* ao óleo essencial já foi evidenciada nos resultados anteriores, e, esta análise, vem contribuir para confirmar esta ação, pois os resultados de inibição obtidos com todas as diluições do óleo essencial são significativamente semelhantes. Entretanto, somente na sua menor diluição (1:2), teve uma ação similar ao padrão Vancomicina, diferindo dos demais antibióticos utilizados neste ensaio.

TABELA 10 – ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL E DOS ANTIBIÓTICOS PADRÕES POR MEIO DA MEDIÇÃO DA REGIÃO DE INIBIÇÃO ENTRE A BORDA DO DISCO/CAVIDADE E O CRESCIMENTO BACTERIANO *

Micro-organismos	(ZI) **									
	Óleo 1:2	Óleo 1:4	Óleo 1:8	Óleo 1:16	AMP 10 µg	ERI 15 µg	GEN 10 µg	PEN 10 µg	TET 30 µg	VAN 30 µg
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	5 c, d	4 d	-	-	14 a	8,33 b, c	11,33 a, b	7,33 b,c,d	13,67 a	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	4,33 c, d	-	-	-	9,33 b, c	13 a, b	11 b	3 d	18 a	2,67 d
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	7 b	5 b	-	-	-	6,33 b	9,33 a, b	-	14 a	-
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	4,33 b	-	-	-	15,67 a	4,67 b	12 a	13 a	4,33 b	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	8,33 d, e	4,33 e	5 e	4 e	36,3 a	27,33 b	16,33 c	31,67 a, b	26 b	12,67 c, d
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	6,33 b,c,d	4 c, d	3,67 d	-	18,67 a, b	23 a	20 a, b	18 a,b,c	21,67 a	13,67 a,b,c,d

* Médias (n=3) seguidas pela mesma letra, na mesma linha (espécie de bactéria), não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,01)

** Valores das regiões de inibição expressos em milímetros (mm); -: sem inibição

O menor resultado de inibição do crescimento de *B. subtilis* foi demonstrado pelo óleo essencial na sua diluição (1:8). Porém, com a diluição (1:4), o óleo essencial exibiu um resultado equivalente ao obtido pelos padrões Penicilina e Vancomicina, e, na sua menor diluição (1:2), provocou uma inibição significativamente semelhante à alcançada pela Ampicilina, Gentamicina, Penicilina e Vancomicina.

Com base nestes resultados pode-se dizer que o óleo essencial extraído das folhas de *L. styraciflua* apresenta ação antibacteriana. As bactérias Gram-positivas, neste ensaio, foram mais sensíveis à ação do óleo essencial do que as Gram-negativas. Como as bactérias Gram-positivas apresentam uma membrana lipopolissacarídica, que restringe a difusão de componentes hidrofóbicos, elas permitem um contato direto dos componentes hidrofóbicos do óleo essencial com a bicamada fosfolipídica da membrana da célula, onde estes provocam os seus efeitos (HANAMANTHAGOURA *et al.*, 2010).

Posteriormente, foi utilizada esta mesma metodologia para avaliar a atividade antifúngica dos extratos das folhas e das cascas e caule, assim como, do

óleo essencial, frente às seguintes leveduras: *Candida glabrata*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* e *Trichosporon beigelli*.

Novamente, os extratos não apresentaram halo de inibição em nenhuma das concentrações testadas, para nenhuma das leveduras utilizadas.

O óleo essencial exibiu atividade antifúngica somente frente a duas leveduras: *Candida albicans* e *Candida tropicalis* (Tabela 11). Os controles negativos, solventes utilizados na diluição do óleo e dos extratos, não apresentaram halo de inibição para nenhuma das leveduras testadas neste ensaio, refletindo que não tiveram participação na ação antifúngica apresentada pelo óleo essencial.

Através da aplicação de um teste de médias é possível verificar que a inibição provocada pelo óleo essencial foi inferior aos padrões-referência utilizados, Cetoconazol e Terbinafina, em todas as suas diluições. *Candida tropicalis* foi mais sensível à ação do óleo essencial, pois houve formação de halo de inibição mesmo com uma maior diluição deste (1:8).

TABELA 11 - VALORES DO HALO DE INIBIÇÃO APRESENTADOS PELAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÓLEO ESSENCIAL, CONTROLE NEGATIVO E CONTROLES POSITIVOS *

Micro-organismos	(ZI mm)**						
	Óleo 1:2	Óleo 1:4	Óleo 1:8	Óleo 1:16	Tween 80 a 10%	Terbinafina	Cetoconazol
<i>Candida glabrata</i>	-	-	-	-	-	22	30
<i>Candida albicans</i>	11,7 c	12 c	-	-	-	31 b	52 a
<i>Candida tropicalis</i>	13 c	13 c	10 d	-	-	55 b	60 a
<i>Candida krusei</i>	-	-	-	-	-	20	35
<i>Trichosporon beigelli</i>	-	-	-	-	-	n	n

*Médias (n=3) seguidas de letras iguais, na mesma linha (espécie de levedura), não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,01)

** Valores das zonas de inibição expressos em mm, incluindo o diâmetro da cavidade de 8mm; -: sem inibição; n: não testado.

O Cetoconazol e a Terbinafina (Figura 15) foram escolhidos como padrões-referência, pois são representantes das duas principais classes de agentes antifúngicos em uso clínico, e, ambos agem inibindo a biossíntese do ergosterol, mas em etapas diferentes. O principal problema destes agentes é que, como não são seletivos, eles podem ser tóxicos para o homem, uma vez que inibem etapas da

biossíntese que são comuns a biossíntese do colesterol e, portanto, as vias biossintéticas que levam aos hormônios sexuais e outros esteróides do hospedeiro (ZACCHINO, 2002).

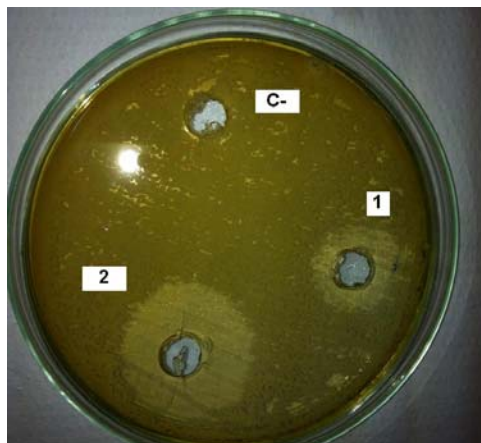


FIGURA 15 – PLACA ILUSTRANDO OS HALOS DE INIBIÇÃO OBTIDOS PELOS PADRÕES-REFERÊNCIA FRENTE À LEVEDURA *C. glabrata*, ATRAVÉS DO MÉTODO DE DIFUSÃO EM MEIO SÓLIDO A PARTIR DE ORIFÍCIO.

FONTE: O AUTOR (2012)

NOTA: 1 = Orifício contendo solução de Terbinafina 50 µg/20 µL; 2 = Orifício contendo solução de Cetoconazol 50 µg/20 µL; C- = Orifício contendo solução de Tween 80 a 10% (controle negativo)

Por este motivo, existe uma grande necessidade da descoberta de novos agentes antifúngicos, mais potentes e, principalmente, mais seguros do que os em uso atualmente. As plantas medicinais e seus metabólitos, com ênfase para os óleos essenciais, apresentam um arsenal de compostos que podem exibir atividades antimicrobianas, o que intensifica as pesquisas nesta área e torna estes resultados importantes.

As diferenças observadas nos valores dos halos de inibição do óleo essencial, quando em contato com os diferentes micro-organismos utilizados neste ensaio, podem ser explicadas pelas características que são próprias de cada espécie. Estes diferentes mecanismos intrínsecos de resistência de cada micro-organismo, a interação destes com os diversos componentes da essência, e, também, a variação na taxa de penetração do componente ativo do óleo essencial através da parede celular e estruturas da membrana celular, torna-os mais ou menos sensíveis à ação antimicrobiana deste óleo essencial (MALINOWSKI, 2010, SILVA, 2012).

Ademais, como o óleo essencial possui uma complexa constituição química, provavelmente, a sua atividade antimicrobiana não está atribuída a um mecanismo

específico, mas sim a vários, que podem resultar em efeitos sinérgicos ou, até mesmo, antagonistas (SILVA, 2012). Portanto, a composição química é um fator determinante na atividade biológica de um óleo essencial, sendo difícil atribuir sua ação a um único e particular composto (MALINOWSKI, 2010).

A informação adquirida pelo método de difusão, seja ele em disco ou em orifício, é qualitativa e útil para estabelecer a sensibilidade dos diferentes micro-organismos (ZACHINO, 2002). Portanto, a vantagem nesta técnica está limitada à geração de dados preliminares, principalmente devido à natureza hidrófoba da maioria dos óleos essenciais de plantas, característica esta que impede a difusão uniforme destas substâncias através do meio contendo Agar (NASCIMENTO *et al.*, 2007).

5.3.2.2 Teste da Microdiluição em Caldo

Para complementar os resultados obtidos pela técnica da difusão em meio sólido a partir de orifícios e, principalmente, para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de cada uma das amostras testadas, foi realizada a metodologia da microdiluição em caldo. Por meio deste ensaio foi possível a determinação da menor concentração de uma amostra que é capaz de inibir o crescimento de diferentes micro-organismos.

A vantagem deste método reside no fato de ser quantitativo, diferentemente das metodologias de difusão em disco ou em cavidades, e de poder ser utilizado tanto para amostras solúveis em água quanto para aquelas lipossolúveis (ZACCHINO, 2002). Com o emprego de microplacas e indicadores químicos de crescimento microbiano, conseguiu-se reduzir o excessivo trabalho envolvido na realização desta técnica, além do consumo de material utilizado. Assim, o método da microdiluição vem sendo cada vez mais utilizado nas pesquisas de potencial antimicrobiano, devido a sua sensibilidade e quantidade mínima de amostras e reagentes, possibilitando um maior número de repetições, o que aumenta a confiabilidade dos resultados (SILVA, 2012).

Neste ensaio, foi possível avaliar o crescimento microbiano através da adição do revelador TTC, pois este composto reage com os íons hidrogênio que são

formados durante a respiração celular, originando uma substância vermelha e insolúvel, conhecida como “formazam”, que indica a presença de micro-organismos viáveis no meio (ANTONIO, 2011). Desta forma, o aparecimento de uma coloração róseo-avermelhada nos poços da microplaca, permitiu a determinação da CIM das amostras e controles (Figura 16).



FIGURA 16 – MICROPLACA COM OS RESULTADOS OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS E CONTROLES FRENTE À BACTÉRIA *S. typhimurium*.
FONTE: O AUTOR (2012)

Os valores de CIM e o tipo de ação encontrada para os extratos e para o óleo essencial de *L.styraciflua* estão expostos nas Tabelas 12 e 13. Os controles negativos, álcool 70% e Tween 80 a 10%, exibiram crescimento microbiano em todas as microplacas, confirmando que não interferem na atividade antimicrobiana das amostras. Os controles de esterilidade do meio não apresentaram crescimento microbiano, assim como, os controles positivos utilizados (Eritromicina 30 µg/mL para as bactérias, Cetoconazol 50 µg/mL e Terbinafina 50 µg/mL para as leveduras), evidenciando a confiabilidade dos resultados obtidos neste ensaio.

De posse destes valores, foram classificadas as atividades antimicrobianas alcançadas pelos extratos seguindo o proposto por Machado e colaboradores (2005), onde valores de CIM menores que 10 µg/mL refletem uma atividade antimicrobiana excelente, valores entre 10 e 100 µg/mL são considerados como boa

atividade, valores entre 100 e 500 µg/mL indicam atividade moderada, e valores acima de 500 µg/mL são considerados como atividade fraca ou nula.

O extrato das folhas exibiu atividade antibacteriana moderada frente a *S. typhimurium*, *E. coli*, *E. aerogenes*, *P. mirabilis*, *S. aureus*, *S. pyogenes* e *B. subtilis*, com valores de CIM variando entre 250 e 500 µg/mL. Entretanto, a atividade antibacteriana deste extrato diante do micro-organismo *E. faecalis* foi fraca/nula, com um valor de CIM de 2000 µg/mL, que foi a concentração inicial testada. A ação deste extrato frente às oito bactérias utilizadas neste ensaio foi bacteriostática, ou seja, ele foi capaz somente de inibir o crescimento da colônia bacteriana, não conseguindo ocasionar a morte de nenhum destes micro-organismos.

No tocante as leveduras, o extrato das folhas apresentou atividade somente contra dois micro-organismos: *C. glabrata*, possuindo uma atividade fraca/nula, já que foi obtido um valor de CIM de 2000 µg/mL, e *T. beigelli*, frente ao qual exibiu uma atividade moderada, chegando a uma CIM = 250 µg/mL, sendo a ação deste extrato em ambas cepas fungistática.

TABELA 12 – CIM (µg/mL) DOS EXTRATOS E ÓLEO ESSENCIAL DE *L. styraciflua*, FRENTE AS CEPAS BACTERIANAS

Micro-organismos	Amostras			
	GRAM	Óleo	Ext Folhas	Ext Cascas e Caule
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	-	1:32 Bacteriostático	500 Bacteriostático	500 Bacteriostático
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	1:32 Bactericida	250 Bacteriostático	500 Bactericida
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	-	1:32 Bactericida	250 Bacteriostático	500 Bacteriostático
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	-	1:16 Bacteriostático	500 Bacteriostático	1000 Bacteriostático
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	+	1:32 Bactericida	250 Bacteriostático	500 Bacteriostático
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	+	1:2 Bacteriostático	2000 Bacteriostático	2000 Bacteriostático
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	+	NAA	250 Bacteriostático	500 Bacteriostático
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	+	1:32 Bacteriostático	500 Bacteriostático	500 Bacteriostático

NAA = Não apresentou atividade antibacteriana

Em relação ao extrato das cascas e caule, verifica-se uma atividade antibacteriana moderada contra *S. typhimurium*, *E. coli*, *E. aerogenes*, *S. aureus*, *S. pyogenes* e *B. subtilis*, com valores de CIM de 500 µg/mL. Por sua vez, diante das cepas *P. mirabilis* e *E. faecalis*, este extrato apresentou atividade fraca/nula, pois os

valores de CIM encontrados foram de 1000 µg/mL e 2000 µg/mL, respectivamente. Somente com a bactéria *E. coli* observamos uma atividade bactericida deste extrato, apresentando atividade bacteriostática frente aos demais micro-organismos.

Dentre as leveduras, a única espécie que não foi sensível à ação do extrato das cascas e caule foi *C. krusei*. O valor de CIM encontrado para este extrato frente *C. glabrata*, *C. albicans* e *C. tropicalis* foi de 2000 µg/mL, enquanto que para a levedura *T. beigelli* foi de 1000 µg/mL, ambos os valores representam uma atividade fraca/nula do extrato diante destes micro-organismos. Em todos os casos citados, o extrato apresentou uma atividade fungistática.

TABELA 13 - CIM (µg/mL) DOS EXTRATOS E ÓLEO ESSENCIAL DE *L.styraciflua*, FRENTE AS LEVEDURAS

Micro-organismos	Amostras		
	Óleo	Ext Folhas	Ext Cascas e Caule
<i>Candida glabrata</i>	NAA	2000	2000
<i>Candida albicans</i>	1:4	Fungistático	Fungistático
<i>Candida tropicalis</i>	Fungistático	NAA	2000
<i>Candida krusei</i>	1:8	NAA	Fungistático
<i>Trichosporon beigelli</i>	Fungistático	NAA	NAA
	1:4	250	1000
	Fungistático	Fungistático	Fungistático

NAA = Não apresentou atividade antifúngica

A atividade antimicrobiana encontrada nos extratos desta espécie pode estar relacionada com a presença de polifenóis, como os flavonóides e taninos, e, também, pela presença de esteróides e/ou triterpenos, pois na literatura é descrita a capacidade antimicrobiana destes compostos.

Os polifenóis podem ser sintetizados pela planta como substâncias de defesa, as fitoalexinas, em resposta a penetração de um invasor, tendo capacidade de inibir o crescimento do mesmo (LIMA, 2002). Estes compostos possuem a capacidade de complexar a parede celular das bactérias, impedindo o seu crescimento e multiplicação. Além disso, alguns flavonóides conseguem inibir o crescimento e multiplicação de micro-organismos por induzirem dano ao DNA bacteriano. Já, os triterpenos, podem ocasionar a perda de fluidez da membrana celular bacteriana, o que reduz a mobilidade bacteriana ou pode levar a ruptura desta (DALMARCO, 2009).

Analisando os resultados encontrados para o óleo essencial frente às cepas bacterianas, verifica-se que este apresentou os menores valores de CIM, possuindo ação sobre todos os micro-organismos analisados, exceto *S. pyogenes*. Diante de *S. typhimurium*, *E. coli*, *E. aerogenes*, *S. aureus* e *B. subtilis* o óleo essencial apresentou um valor de CIM de 1:32, ou seja, na concentração de 3,125% ele ainda foi capaz de inibir o crescimento destes micro-organismos, refletindo sua ótima atividade antibacteriana, que já havia sido evidenciada pelo ensaio da difusão em meio sólido a partir de orifícios.

Contra a bactéria *P. mirabilis* o óleo essencial exibiu um valor de CIM de 1:16, valor este que remete a uma boa atividade antibacteriana, já que mesmo numa concentração baixa (6,25%) o óleo essencial promoveu ação bacteriostática diante deste micro-organismo. Assim como o extrato das folhas e o extrato das cascas e caule, o óleo apresentou fraca atividade antibacteriana diante de *E. faecalis*, obtendo um valor de CIM de 1:2 (referente a uma concentração de 50%).

Um destaque deve ser dado à ação do óleo essencial contra as bactérias *E. coli*, *E. aerogenes* e *S. aureus*, uma vez que foi capaz de ocasionar a morte destas, sendo, portanto, detentor de atividade bactericida. No tocante as demais cepas bacterianas, o óleo exibiu atividade bacteriostática.

A atividade bactericida do óleo essencial diante de *S. aureus* é um dado de extrema valia, pois este micro-organismo é um agente etiológico importante, que está associado a infecções adquiridas, tanto em hospitais quanto na comunidade, e que se tornou um paradigma das infecções bacterianas. Ele destaca-se pela sua elevada frequência e patogenicidade, sendo capaz de provocar doenças em indivíduos imunocomprometidos e em indivíduos saudáveis, além de possuir uma alta versatilidade em adquirir resistência aos antimicrobianos, surgindo as chamadas linhagens multi-resistentes de *Staphylococcus aureus* (MRSA), tornando-se uma preocupação universal (FERRONATO *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2010). Por este motivo, uma substância com capacidade bactericida frente esta cepa bacteriana poderá ser de muita utilidade, porque conseguindo provocar a morte deste micro-organismo, elimina-se a recorrência da infecção, podendo então auxiliar em tratamentos mais prolongados, além de reduzir a possibilidade de resistência microbiana.

Em relação às leveduras, somente *C. glabrata* e *C. krusei* não foram sensíveis à ação do óleo essencial. Diante de *C. albicans* e *T. beigelli*, o óleo

essencial apresentou uma CIM = 1:4, valor relativamente alto, uma vez que representa uma atividade do óleo essencial até mesmo na concentração de 25%. O menor valor de CIM encontrado para o óleo essencial ocorreu frente à cepa *C. tropicalis* (1:8), portanto, conseguindo inibir o crescimento deste micro-organismo até a sua concentração de 12,5%. A maior sensibilidade de *C. tropicalis* à ação do óleo essencial também foi encontrada na técnica da difusão em meio sólido a partir de orifícios, o que corrobora com os resultados aqui apresentados. A ação do óleo essencial contra estas leveduras foi, em todos os casos citados, fungistática.

Dentre as várias espécies de leveduras descritas, as que pertencem ao gênero *Candida* são os maiores agentes de infecção hospitalar e representam um desafio para a sobrevivência de pacientes com doenças graves e aqueles em período pós-operatório. Hospitais norte-americanos com sistema de vigilância operante notificaram *Candida* como o sexto patógeno nosocomial e a quarta causa mais comum de infecções de corrente sanguínea, adquiridas em hospitais (ANVISA, 2004).

Estes dados tornam relevantes os resultados obtidos com o óleo essencial diante das espécies de *Candida*, pois várias espécies já apresentam resistência a medicamentos sintéticos. Outro fator importante é que, para uso humano, existem limitadas opções terapêuticas, as quais apresentam sérios problemas, como é o caso do cetoconazol, e outros azóis, que produzem hepatite e problemas endócrinos (ZACCHINO, 2002). Assim sendo, há uma necessidade muito grande na descoberta de novos agentes antifúngicos, e, diante disso, os produtos naturais, como estes avaliados, surgem como um caminho extremamente viável para a busca de alternativas contra a ação destes micro-organismos patogênicos.

Já é bem reconhecida a capacidade antimicrobiana de uma grande variedade de óleos essenciais, sendo que, na maioria dos casos, esta atividade é devida à presença de constituintes ativos e atribuída principalmente aos isoprenos, como monoterpenos, sesquiterpenos e álcoois relacionados, outros hidrocarbonetos e fenóis (KOROCH, JULIANI e ZYGADLO, 2007). Entretanto, o mecanismo de ação destes compostos ainda não está completamente elucidado, mas sabe-se que algumas destas substâncias podem inibir a síntese dos ácidos nucleicos (DNA e RNA), interferindo na formação de purina ou pirimidina ou bloqueando a polimerização dos nucleotídeos, podendo agir também na inibição da parede celular

e lesão da mesma, além de interferirem no metabolismo de energia primária destes micro-organismos (LIMA, 2002).

Normalmente, componentes majoritários são os responsáveis pela atividade antimicrobiana na maioria dos óleos essenciais, mas, em alguns estudos, foi verificado que o óleo essencial como um todo exibiu uma maior atividade antimicrobiana do que os compostos majoritários isolados, indicando que os compostos minoritários podem ser críticos para esta atividade, provavelmente produzindo um efeito sinérgico (KOROCH, JULIANI e ZYGADLO, 2007).

Em um estudo realizado com o óleo essencial de *Liquidambar orientallis* (Altingiaceae) contra o nematoide *Bursaphelenchus xylophilus*, o principal nematoide que afeta a madeira do pinho, ficou comprovada a excelente atividade nematicida deste óleo, ocasionando 100% de mortalidade nas concentrações de 2.0 mg/mL, 1.0 mg/mL e 0,8mg/mL. Neste mesmo estudo, também foram identificados os seus constituintes, apresentando como majoritários o álcool hidrocinaamil (41,13%) e o álcool trans-cinaamil (45,07%), que também foram testados quanto ao seu potencial nematicida. Os resultados obtidos mostraram que, mesmo em concentrações inferiores a do óleo essencial (até 0.6 mg/mL), o álcool trans-cinaamil exibiu 100% de atividade nematicida (KIM *et al.*, 2008).

Diante de todos os dados que foram obtidos nesta pesquisa, com o óleo essencial e os extratos das partes aéreas de *L. styraciflua*, juntamente com todos os registros encontrados na literatura a cerca da potencialidade antimicrobiana de muitas plantas, é possível concluir que os produtos naturais possuem uma grande importância como perspectiva para a produção de novos e eficientes produtos farmacêuticos, que possam ser utilizados na medicina para a terapêutica de processos infecciosos.

5.3.3 Atividade Hemolítica

5.3.3.1 Atividade Hemolítica em Placas de Agar Sangue

A avaliação da atividade hemolítica em placas de Agar sangue foi realizada com o extrato hidroalcoólico das folhas e suas respectivas frações orgânicas, com o extrato hidroalcoólico das cascas e caule, assim como, com as suas frações, e com o óleo essencial extraído das folhas. Neste ensaio, somente a fração butanol das folhas e o óleo essencial apresentaram resultados positivos.

A fração butanol das folhas apresentou um halo de hemólise de 8 mm, e o óleo essencial puro teve um halo de hemólise de $9,67\text{mm} \pm 1,15$ (resultados correspondem a média de três repetições \pm desvio padrão, incluído o diâmetro do disco de 6mm).

As Figuras 17 e 18 ilustram os resultados obtidos para estas amostras.

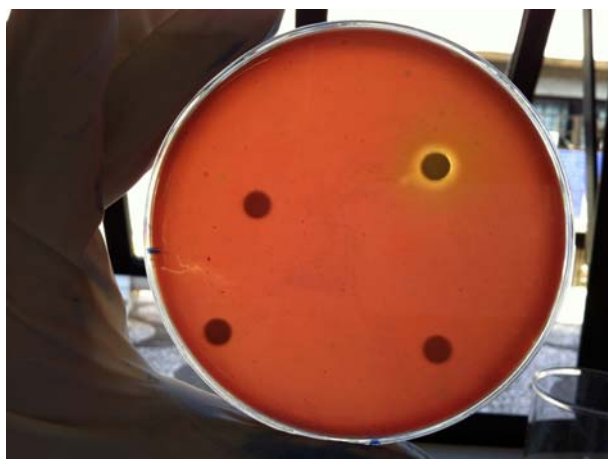


FIGURA 17 – PLACA DE AGAR SANGUE COM HALO DE HEMÓLISE DO ÓLEO ESSENCIAL (SUPERIOR DIREITO) E DEMAIS DISCOS REPRESENTANDO O RESULTADO NEGATIVO, SEM HALO DE HEMÓLISE.

FONTE: O AUTOR (2012)

Através da hemólise, ocorre a liberação de hemoglobina livre no plasma, o que pode acarretar em sérios danos a órgãos vitais como o fígado, os rins e o coração (CARVALHO *et al.*, 2007), tornando-se extremamente necessário a verificação desta atividade em extratos de plantas. O teste da hemólise é

preconizado pela OMS no seu manual de controle de qualidade de produtos vegetais (1998), e também é encontrado como parte dos ensaios toxicológicos recomendados no Guia para Avaliação da Segurança de Produtos Cosméticos (ANVISA, 2003).



FIGURA 18 – PLACA DE AGAR SANGUE COM HALO DE HEMÓLISE DO ÓLEO ESSENCIAL E DA FRAÇÃO BUTANOL DAS FOLHAS DE *Liquidambar styraciflua*.

FONTE: O AUTOR (2012)

NOTA: F3F = Disco impregnado com fração acetato de etila das folhas de *L. styraciflua*; F4F = Disco impregnado com fração butanol das folhas de *L. styraciflua*; F5F = Disco impregnado com fração hidroalcoólica das folhas de *L. styraciflua*; O = Disco impregnado com óleo essencial das folhas de *L. styraciflua*.

Portanto, os resultados encontrados neste teste conduzem a uma avaliação preliminar da toxicidade dos extratos, frações e do óleo essencial de *L. styraciflua*. Este dado é de extrema importância na busca de um novo fitoterápico, pois a presença de toxicidade restringe a sua utilização, sendo então necessária a determinação da dose letal (DL_{50}) para o seu uso.

5.3.3.2 Atividade Hemolítica em Tubos de Sangue de Carneiro

Os extratos brutos das folhas e das cascas e caule de *L. styraciflua*, suas respectivas frações e o óleo essencial das suas folhas foram submetidos ao ensaio que avalia a atividade hemolítica em tubos contendo sangue de carneiro (Figura 19), seguindo as recomendações propostas pela literatura.

No teste preliminar, nenhuma das amostras citadas apresentou uma solução límpida, vermelha e sem depósito de eritrócitos, resultado este que seria indicativo de hemólise total (ruptura dos eritrócitos ocasionando a liberação da hemoglobina).



FIGURA 19 – TUBOS CONTENDO AS AMOSTRAS QUE FORAM SUBMETIDAS AO ENSAIO DE ATIVIDADE HEMOLÍTICA COM SANGUE DE CARNEIRO.
FONTE: O AUTOR (2012)

Em todos os tubos, após a centrifugação, ocorreu a formação de uma solução incolor com depósito de eritrócitos no fundo do tubo, representado na Figura 20, o que indica um resultado negativo segundo a literatura, ou seja, as amostras não apresentaram atividade hemolítica neste ensaio. Por este motivo, não foi necessário realizar a segunda bateria de diluições proposta pela metodologia utilizada.

Este ensaio é preconizado pela Farmacopéia Brasileira (2010) e pela OMS (1998) para a avaliação da atividade hemolítica de extratos de plantas, e os resultados encontrados refletem na análise toxicológica dos mesmos. Por meio do ensaio de difusão em placas de Agar sangue encontramos resultado positivo para duas amostras, já, nesta técnica, todas exibiram um resultado negativo. Portanto, se faz necessário a realização de uma terceira técnica para a confirmação destes resultados.



FIGURA 20 – TUBOS EXIBINDO RESULTADO NEGATIVO PARA ATIVIDADE HEMOLÍTICA, DEVIDO A PRESENÇA DE SOLUÇÃO LÍMPIDA COM DEPÓSITO DE ERITRÓCITOS AO FUNDO.
FONTE: O AUTOR (2012)

A toxicidade que pode ser encontrada em plantas é devida, principalmente, a presença da classe dos alcalóides, metabólitos secundários que são geralmente dotados de elevada toxicidade, motivo pelo qual são utilizados pelas plantas para a sua defesa, podendo provocar danos moderados a severos no organismo humano (COSTA, 2002).

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos é possível concluir que:

- A partir das folhas secas e das cascas e caule secos de *Liquidambar styraciflua* foram obtidos os dois extratos hidroalcoólicos que foram utilizados nos testes biológicos.
- Por meio destes extratos, foram realizadas extrações líquido/líquido, permitindo a obtenção das frações orgânicas de cada órgão vegetal (Hexano, Clorofórmio, Acetato de etila, Butanol e Hidroalcoólica remanescente).
- As folhas secas de *L. styraciflua* forneceram, através da técnica de hidrodestilação, um óleo essencial com coloração amarelo-esverdeada e odor aromático.
- Avaliando a capacidade antioxidante pelo método do fosfomolibdênio, o melhor resultado foi encontrado com a fração acetato de etila das cascas e caule, que exibiu valores de capacidade antioxidante total e de porcentagem de atividade antioxidante relativa superiores aos apresentados pelos padrões-referência utilizados.
- Pela metodologia do DPPH, a fração butanol das cascas e caule obteve um valor de porcentagem de atividade antioxidante superior ao encontrado para rutina, ácido gálico e ácido ascórbico, com um valor de concentração eficiente próximo ao exibido pelo padrão-referência rutina.
- O extrato das folhas e o extrato das cascas e caule apresentaram atividade antimicrobiana moderada, porém, o óleo essencial exibiu resultados promissores, com atividade diante de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras, apresentando baixos valores de CIM e ação bactericida frente algumas cepas.
- Atividade hemolítica foi encontrada na fração butanol das folhas e no óleo essencial pelo teste da difusão, entretanto, com o ensaio em tubos de sangue, este dado não se confirmou, sendo necessária a realização de uma terceira técnica para confirmação destes resultados.

Portanto, *Liquidambar styraciflua* apresenta um potencial biológico para ser aprofundado, principalmente no que diz respeito a sua capacidade antioxidante e propriedades antimicrobianas, viabilizando a obtenção de um novo fitoterápico com segurança, eficácia e qualidade.

No tocante ao óleo essencial, novos estudos a fim de verificar a possibilidade de sinergismo deste com antibióticos padrões seriam viáveis, devido ao potencial antimicrobiano encontrado, podendo proporcionar um ganho no tratamento de processos infecciosos.

Para dar continuidade com os estudos desta espécie, sugere-se também o isolamento de compostos, pois podem ser encontrados novos princípios ativos para o tratamento de diversas enfermidades, como inflamações, doenças neurodegenerativas e circulatórias, tratamento da hipertensão e na prevenção do envelhecimento.

REFERÊNCIAS

ABRECHT, S.; HARRINGTON, P.; IDING, H.; KARPFF, M.; TRUSSARDI, R.; WIRZ, B.; ZUTTER, U. . The Synthetic Development of the Antiinfluenza Neuraminidase Inhibitor Oseltamivir Phosphate (Tamiflu): A Challenge for Synthesis & Process Research. **ChemInform**, v.36, n.30, 2005.

ADORJAN, B.; BUCHBAUER, G. Biological properties of essential oils: an updated review. **Flavour and Fragrance Journal**, v.25, p.407–426, 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos. Brasília, 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Detecção e identificação de fungos de importância médica: Módulo VII. Brasília, 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Registro de medicamentos fitoterápicos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/registro.htm>>. Acesso em 04/05/2012.

ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA JUNIOR, A.; ZANI, C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Mem I Oswaldo Cruz**, v.95, p. 367-373, 2000.

ANGIONI, A., BARRA, A., CORONEO, V., DESSI, S., CABRAS, P. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.4364–4370, 2006.

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP (APG). An ordinal classification for the families of flowering plants. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 85, p. 531-553, 1998.

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP (APG II). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering Plants. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.141, p.399-436, 2003.

ANTIMICROBE. Disponível em: <<http://www.antimicrobe.org/b239.asp>>. Acesso em: 23/10/2012.

ANTÔNIO, R.D. **Caracterização fitoquímica, morfoanatômica e atividades biológicas de *Eucalyptus badjensis* Beuzev. & Welch, Myrtaceae.** 110 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2011.

ANTUNES, R. M. P.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; CAMARA, C. A.; ARRUDA, T. A.; CATÃO, R. M. R.; BARBOSA, T. P.; NUNES, X. P.; DIAS, C. S.; SILVA, T. M. S.

Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.4, p.517-524, 2006.

ARAÚJO, T. A. S.; ALENCAR, N. L.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, v.120, p.72-80, 2008.

ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Food Science and Technology**, v.11, p.419-421, 2000.

AYRES, M. C. C.; BRANDÃO, M. S.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; MENOR, J. C. A. S.; SILVA, H. B.; SOARES, M. J. S.; CHAVES, M. H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.90-97, 2008.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p.446–475, 2008.

BARBOSA, V. F. **Caracterização do perfil da ação do ácido gálico e seus derivados sobre processos oxidativos in vitro e ex vivo** 85f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Araraquara, 2010.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American Journal Clinical Pathology**, v.45, p.493-496, 1966.

BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C. **Plantas Aromáticas: do cultivo à produção de óleo essencial**. 1ª ed. Curitiba: Layer Studio Gráfico e Editora LTDA, 2009.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v.32, n.3, p.588-594, 2009.

BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of stable free radical. **Nature**, v.181, p.1199-1959, 1958.

BOGLE, A. L. The floral morphology and vascular anatomy of the Hamamelidaceae: subfamily Liquidambaroideae. **Ann. Mo. Bot. Gard.**, v.73, p.325-347, 1986.

BOSCARDIN, P. M. D. **Morfoanatomia, fitoquímica e atividades biológicas de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage-Myrtaceae**. 139f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

BRASILSUS. Disponível em: <<http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/rdc/103507-14.html>>. Acesso em: 08/05/ 2012.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lwt – Food Science and Technology**, v.2, p.25-30, 1995.

BRUNI, R.; MEDICI, A.; ANDREOTTI, E.; FANTIN, C.; MUZZOLI, M.; DEHESA, M. Chemical composition and biological activities of Isphingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. **Food Chemistry**, v.85, p.415–421, 2003.

CALIXTO, J. B. Medicamentos Fitoterápicos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: ARGOS, 2002. p.297-316.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p.1914–1920, 2002.

CARVALHO, E. B.; BORGES, E. L.; CARLOS, L. M. B.; SILVA, M. A. M.; MAGALHÃES, S. M. M.; GOMES, F. V. B. A. F.; CARVALHO, M. J. C.; QUIXADÁ, A. T. S.; PITOMBEIRA, M. H. S. Efeito da bomba de infusão de soluções sobre o grau de hemólise em concentrados de hemácias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.29, n.2, p.149-152, 2007.

CHANG, H.-T. Hamamelidaceae. In H.-T. CHANG [ed.]. **Flora Reipublicae Popularis Sinicae**. Beijing, China: Science Press, 1979. v.35, n.2, p.36-116.

COELHO-DE-SOUZA, A. N.; CRIDDLE, D. N.; LEAL-CARDOSO, J. H. Selective modulatory effects of the essential oil of *Croton zehntneri* on isolated smooth muscle preparations of the guinea-pig. **Phytotherapy Research**, v.12, n.3, p.189-194, 1998.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 6ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p.564-582, 1999.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981.

DALMARCO, J. B. **Lotus corniculatus L. cv. São Gabriel: Análise Fitoquímica e Atividade Biológica**. 91f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2009.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, p.446-452, 2006.

DURKOVIC, J.; LUX, A. Micropropagation with a novel pattern of adventitious rooting in American sweetgum (*Liquidambar styraciflua* L.). **Trees**, v. 24, p. 491-497, 2010.

ENDRESS, P. K. A suprageneric taxonomic classification of the Hamamelidaceae. **Taxon**, v. 38, p. 371-376, 1989.

ENDRESS, P. K.; IGERSEIM, A. Gynoecium diversity and systematics of the basal eudicots. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.130, p.305-393, 1999.

ENRICH, L. B.; SCHEUERMANN, M. L.; MOHADJER, A.; MATTHIAS, K. R.; ELLER, C. F.; NEWMAN, M. S.; FUJINAKA, M.; POON, T. *Liquidambar styraciflua*: a renewable source of shikimic acid. **Tetrahedron Letters**, v.49, p.2503-2505, 2008.

ERNST, W. R. The genera of Hamamelidaceae and Platanaceae in the southeastern United States. **Journal of the Arnold Arboretum**, v. 44, p.193-210, 1963.

EVANS, W. C. **Trease and Evans pharmacognosy**. 14^a ed. London: W. B. Saunders, 1996. 612 p.

FABROWSKI, F. J. ***Eucalyptus smithii* R. T. Baker (Myrtaceae) como espécie produtora de óleo essencial no sul do Brasil**. 225 f. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

FARMACOPÉIA Brasileira. 5^a ed. Brasília. Volume I. 2010.

FARMACOPÉIA Brasileira. 5^a ed. Brasília. Volume II. 2010.

FERGUSON, D. K. A survey of the Liquidambaroideae (Hamamelidaceae) with a view to elucidating its fossil record. In: P. R. CRANE e S. BLACKMORE. **Evolution, systematics, and fossil history of the Hamamelidae**. Oxford, UK: Clarendon Press, 1989. v.1, p.249-272.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

FERREIRA, S. B.; PALMEIRA, J. D.; SOUZA, J. H.; ALMEIDA, J. M.; FIGUEIREDO, M. C. P.; PEQUENO, A. S.; ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P. & C.; RAMALHO, R. M. Avaliação da Atividade Antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcolico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.42, n.1, p.27-31, 2010.

FERRONATTO, R.; MARCHESAN, E. D.; PEZENTI, E.; BEDNARSKI, F.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.2, p.224-230, 2007.

FILHO, D. W.; SILVA, E. L.; BOVERIS, A. Flavonóides Antioxidantes de Plantas Medicinais e Alimentos: Importância e Perspectivas Terapêuticas. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: ARGOS, 2002. p.317-334.

FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, n.3, p.291-296, 2005.

FLORIDATA. Disponível em: <<http://www.floridata.com/ref/l/liquidam.cfm>>. Acesso em: 18/10/2011.

GUBA, R. Toxicity myths – essential oils and their carcinogenic potential. **International Journal of Aromatherapy**, v.11, p.76-83, 2001.

HAJHASHEMI, V.; SADRAEI, H.; GHANNADI, A. R.; MOHSENI, M. Antispasmodic and anti-diarrhoeal effect of *Satureja hortensis* L. essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.71, p.187-192, 2000.

HANAMANTHAGOUDA, M. S.; KAKKALAMELI, S. B.; NAIK, P. M.; NAGELLA, P.; SEETHARAMAREDDY, H. R.; MURTHY, H.N. Essential oils of *Lavandula bipinnata* and their antimicrobial activities. **Food Chemistry**, v.118, p.836-839, 2010.

HARBORNE, J. B.; DEY, P. M. **Plant Biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1997.

HARMS, H. Hamamelidaceae. In: ENGLER, A., PRANTL, K. **As Famílias de Plantas Naturais**. 2ª edição. Engelmann, Leipzig, 1930. p.303-343.

ICKERT-BOND, S. M., PIGG, K. B., WEN, J. Comparative infructescence morphology in Liquidambar (Altingiaceae) and its evolutionary significance. **American Journal of Botany**, v.92, p.1234-1255, 2005.

ICKERT-BOND, S. M.; WEN, J. Phylogeny and biogeography of Altingiaceae: Evidence from combined analysis of five non-coding chloroplast regions. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.39, p.512-528, 2006.

INPI. Disponível em: <<http://www.ipni.org>>. Acesso em: 07/05/2012.

KIM, J.; SEO, S.; LEE, S.; SHIN, S.; PARK, I. Nematicidal Activity of Plant Essential Oils and Components from Coriander (*Coriandrum sativum*), Oriental Sweetgum (*Liquidambar orientalis*), and Valerian (*Valeriana wallichii*) Essential Oils against Pine Wood Nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.7316–7320, 2008.

KOROCH, A. R.; JULIANI, H. R.; ZYGADLO, J. A. Bioactivity of Essential Oils and Their Components. In: BERGER, R.G. **Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability**. Berlim: Springer, 2007. p. 87-117.

LAVABRE, M. **Aromaterapia: a cura pelos óleos essenciais**. Rio de Janeiro: Record, 1992. 172p.

LIMA, E. O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: ARGOS, 2002. p.481-501.

LOEWE MUÑOZ, V. Apuntes sobre algunas latifoliadas de maderas valiosas: 3.– Liquidambar (*Liquidambar styraciflua* L.). **Ciência e Investigación Forestal**, v.2, n.6, p.335-348, 1992.

LOPES, R. M.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S. Flavonóides. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v.3, n.14, p.18-22, 2000.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M.; TORRES, M. A. V.; BACHER, L. B. *Árvores exóticas no Brasil: madeiras, ornamentais e aromáticas*. 1ª edição. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarium de Estudos da Flora, 2003. p.148

MACHADO, M.; CECHINEL FILHO, V.; TESSAROLO, R.; MALLMANN, R.; SILVA, C. M.; CRUZ, A. B. Potent antibacterial activity of *Eugenia umbelliflora*. **Pharmaceutical Biology**, v.43, n.7, p.636-639, 2005.

MALINOWSKI, L. R. L. **Morfoanatomia, Fitoquímica e Atividades Biológicas de folhas jovens de *Eucalyptus globulus* LABILL. subespécie *bicostata* (MAIDEN et al.) J. B. KIRKPAT., MYRTACEAE**. 117f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

MARTIN, E.; DUKE, J.; PELKKI, M.; CLAUSEN, E. C.; CARRIER, D. J. Sweetgum (*Liquidambar styraciflua* L.): Extraction of Shikimic Acid Coupled to Dilute Acid Pretreatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.162, p.1660–1668, 2010.

MASOTTI, V.; JUTEAU, F.; BESSIERE, J. M.; VIANO, J. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.7115–7121, 2003.

MATTOS, P. P.; PEREIRA, J. C. D.; SCHAITZA, E. G.; CARVALHO, P. E. R. **Características da madeira de *Liquidambar styraciflua***. Colombo: EMBRAPA FLORESTAS, 2001. p.1-4. Circular Técnica.

MEIKLE, R. D. **Flora of Cyprus**. Kew, UK: Royal Botanic Gardens, 1977. v.1.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise fitoquímica. Tribuna Farmacêutica, Curitiba, v.47, n.1, p.1 – 19, 1979.

MORRIS, A. B.; ICKERT-BOND, S. M.; BRUNSON, D. B.; SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. Phylogeographical structure and temporal complexity in American sweetgum (*Liquidambar styraciflua*; Altingiaceae). **Molecular Ecology**, v.17, p.3889–3900, 2008.

MOSQUERA, O. M.; CORRERA, Y. M.; NIÑO, J. Antioxidant activity of plant extracts from Colombian flora. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.2A, p.382-387, 2009.

NAKASHIMA, T. **Étude phytochimique évaluation dès activités antifongiques et antivirales de trois Verbenaceae: *Lippia alba* N. B. Brown, *Lippia multiflora* Mold., *Citharexylum myrianthum* Cham.** 198f. These INP, Toulouse, France, 1993.

NAKASHIMA, T. Fotos da espécie *Liquidambar styraciflua* L. CD-ROM. Curitiba, 2012.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, P. O.; BARBOSA JÚNIOR, A. M.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.108-113, 2007.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Information supplement 15th M100-S15. Wayne. PA: NCCLS/CLSI, 2005/CLSI. 2005.

NEERA, S.; ARAKAWA, H.; ISHIMARU, K. Tannin production in cell cultures of *Liquidambar styraciflua*. **Phytochemistry**, v.32, n.4, p.921-924, 1993.

OHNO, O.; YE, M.; KOYAMA, T.; YAZAWA, K.; MURA, E.; MATSUMOTO, H.; ICHINO, T.; YAMADA, K.; NAKAMURA, K.; OHNO, T.; YAMAGUCHI, K.; ISHIDA, J.; FUKAMIZU, A.; UEMURA, D. Inhibitory effects of benzyl benzoate and its derivatives on angiotensin II-induced hypertension. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.16, p.7843–7852, 2008.

ÓLEOS essenciais de eucalipto. **Revista da Madeira**, n.75, 2003. Disponível em: <http://www.remade.com.br/br/revistadamadeira_materia.php?num=407&subject=%D3leos%20Essenciais&title=%D3leos%20essenciais%20de%20eucalipto>. Acesso em: 23/04/2011.

OLIVEIRA, A. R. M.; SZCZERBOWSKI, D. Quinina: 470 anos de história, controvérsias e desenvolvimento. **Química Nova**, v.32, n.7, p.1971-1974, 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Quality control methods for medicinal plants methods. 1998. p.41 – 43.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v.56, p.237-243, 2001.

PIGG, K. B.; ICKERT-BOND, S. M.; WEN, J. Anatomically preserved *Liquidambar* (Altingiaceae) from the Middle Miocene of Yakima Canyon, Washington State, USA, and its biogeographic implications. **American Journal of Botany**, v.91, p.499-509, 2004.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.25, n.1, p.45-61, 2002.

PLANTASONYA. Disponível em: <<http://www.plantasonya.com.br/arvores-e-palmeiras/liquidambar-liquidambar-styraciflua-2.html>>. Acesso em: 18/10/ 2011.

PORTAL DA SAUDE. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/Gestor/visualizar_texto.cfm?idtxt=35352>. Acesso em: 07/05/ 2012.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v.269, p.337-341, 1999.

QUI, Y.-L.; CHASE, M.; HOOT, S.; CONTI, S.; CRANE, P. R.; SYTDMA, K. J.; PARKS, C. R. Phylogenetics of the Hamamelidae and their allies: parsimony analyses of nucleotide sequences of the plastid gene *rbcl*. **International Journal of Plant Sciences**, v.159, p.891-905, 1998.

REINSCH, A. Über die anatomischen Verhältnisse der Hamamelidaceae mit Rücksicht auf ihre systematische Gruppierungen. **Botanische Jahrbücher für Systematik**, v.11, p.347-395, 1890.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997. p.131-143.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in food. **Food Chemistry**, v.91, p.621–632, 2005.

SADRAEI, H.; ASGHARI, G. R.; HAJHASHEMI, V.; KOLAGAR, A.; EBRAHIMI, M. Spasmolytic activity of essential oil and various extracts of *Ferula gummosa* Boiss. on ileum contractions. **Phytomedicine**, v.8, p.370-376, 2001.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6^a ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/UFRGS, 2007. p.403-434.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6^a ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/UFRGS, 2007. p.517-537.

SCHMIDT, C.; FRONZA, M.; GOETTERT, M.; GELLER, F.; LUIK, S.; FLORES, E. M. M.; BITTENCOURT, C. F.; ZANETTI, G. D.; HEINZMANN, B. M.; LAUFER, S.; MERFORT, I. Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v.122, p.523–532, 2009.

SHI, S.; HUANG, Y.; ZHONG, Y.; DU, Y.; ZHANG, Q.; CHANG, H.; BOUFFORD, D. E. Phylogeny of the Altingiaceae based on cpDNA matK, PY-IGS e nrDNA ITS sequences. **Plant Systematics and Evolution**, v.230, p.13-24, 2001.

SHIMIZU, J. Y.; SPIR, I. H. Z. Avaliação de procedências e progênies de Liquidambar da América Central, do México e dos Estados Unidos, em Agudos, Brasil. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n.39, p.93-108, 1999.

SHIMIZU, J. Y.; SPIR, I. H. Z. Produtividade de madeira de Liquidambar (*Liquidambar styraciflua* L.) de diferentes procedências em Quedas do Iguaçu, PR. **Revista Árvore**, v.28, n.4, p.487-491, 2004.

SHIMIZU, J. Y. *Liquidambar* para produção de madeira no Sul e Sudeste do Brasil. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n.50, p.127-138, 2005.

SILVA, J.; ABEBE, W.; SOUSA, S. M.; DUARTE, V. G.; MACHADO, M. I. L.; MATOS, F. J. A. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.89, n.2, p.277-283, 2003.

SILVA, S. M. **Morfoanatomia, identificação química e determinação de bioatividades dos óleos essenciais e extratos de folhas, flores e frutos de *Eucalyptus cinerea* F. MUELL. ex BENTH., MYRTACEAE**. 151f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

SILVA, S. M.; ABE, S. Y.; MURAKAMI, F. S.; FRENSCH, G.; MARQUES, F. A.; NAKASHIMA, T. Essential Oils from Different Plant Parts of *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex Benth. (Myrtaceae) as a Source of 1,8-Cineole and Their Bioactivities. **Pharmaceuticals**, v.4, n.12, p.1535-1550, 2011.

SILVEIRA, L. M. S.; OLEA, R. S. G.; MESQUITA, J. S.; DA CRUZ, A. L. N.; MENDES, J. C. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.90, n.2, p.124-128, 2009.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6^a ed. Porto Alegre: Universidade / UFRGS, 2007. Cap. 18.

SOUSA, C.M.M.; ROCHA e SILVA, H.; VIEIRA-JR., G.M.; AYRES, M.C.C.; DA COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30, n.2, p.351-355, 2007.

SOUZA, M.M.; CRUZ, A.B.; SCHUMACHER, M.B.; KREUGER, M.R.O.; FREITAS, R.A.; CRUZ, R.C.B. Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos. In: BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. **Ciências farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: Univali, 2003. p.109-166.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.310-334.

TATTJE, D. H. E.; BUS, R. Valeranone, Valeranal and Vitispirane in the leaf oil of *Liquidambar styraciflua*. **Phytochemistry**, v.18, p. 876, 1979.

TROPICOS. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/15100008>>. Acesso em: 23/05/ 2012.

USP XXVIII (UNITED STATES PHARMACOPEIA). Rockville. United States Pharmacopeial Convention, 2005.

VELJIC, M.; CIRIC, A.; SOKOVIC, M.; JANACKOVIC, P.; MARIN, P. D. Antibacterial and antifungal activity of the liverwort (*Ptilidium pulcherrimum*) methanol extract. **Archives of Biological Sciences**, v.62, n.2, p.381-385, 2010.

WARD, P.; SMALL, I.; SMITH, J.; SUTER, P.; DUTKOWSKI, R. P. Oseltamivir (Tamiflu) and its potential for use in the event of an influenza pandemic. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.55, n.1, p.5-21, 2005.

WANG, K.; PAN, Y.; WANG, H.; ZHANG, Y.; LEI, Q.; ZHU, Z.; LI, H.; LIANG, M. Antioxidant activities of *Liquidambar formosana* Hance leaf extracts. **Medicinal Chemistry Research**, v.19, p.166–176, 2010.

WEN, J. Evolution of the eastern Asian and eastern North American disjunct pattern: insights from phylogenetic studies. **Korean Journal of Plant Taxonomy**, v.28, p.63-81, 1998.

WEN, J. Evolution of eastern Asian and eastern North American disjunct distributions in flowering plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.30, p.421-455, 1999.

WEN, J. Evolution of eastern Asian-eastern North American biogeographic disjunctions: a few additional issues. **International Journal of Plant Sciences**, v.162, p. S117-S122, 2001.

World Health Organization (WHO). Traditional medicine, 2008. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en>>, Acesso em: 10/04/ 2011.

WILLIAMS, J. Amentaceae. In: BALFOUR, J.H. **A manual of botany: being an introduction to the study of the structure, physiology, and classification of plants**. 3^a edição. Londres, UK: Griffin, 1855.

YANG, N-Y.; CHEN, J-H.; ZHOU, G-S.; TANG, Y-P.; DUAN, J-A.; TIAN, L-J.; LIU, X-H. Pentacyclic triterpenes from the resin of *Liquidambar formosana*. **Fitoterapia**, v.82, p.927–931, 2011.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármacos segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas**

Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna. Chapecó: ARGOS, 2002. p.17-44.

ZACCHINO, S. Estratégias para a descoberta de novo agentes antifúngicos. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna.** Chapecó: ARGOS, 2002. p.435-479.

ZANON, B. R.; LIMA, I. L.; LONGUI, E. L.; FLORSHEIM, S. M. B. Variação de algumas propriedades físicas e anatômicas da madeira de *Liquidambar styraciflua* L. (sweet gum) em função da posição radial na tora em diferentes classes de diâmetro. **Instituto Florestal Série Registro**, n.40, p.69-74, 2009.

ZHANG, Z.-Y.; ZHANG, H.-T.; ENDRESS, P.K. Hamamelidaceae. In: WU, Z.Y.; RAVEN, P.H. e HONG, D.Y. **Flora of China.** Beijing, China: Science Press, 2003. v.9, p.18-42.

ZUANAZZI, J. A. S. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. . **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6^a ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/UFRGS, 2007. p.489-516.